

Aus der Klinik für Innere Medizin I  
(Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

EVALUIERUNG L1CAM BLOCKIERENDER ANTIKÖRPER  
ZUR  
CHEMOSENSITIVIERUNG HOCHMALIGNER  
UND  
CHEMORESISTENTER TUMORE

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
CHANTAL DIECKMANN  
aus Recklinghausen

Kiel 2011

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Sebens, Klinik für Allgemeine Innere Medizin
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Wesch, Institut für Immunologie
Tag der mündlichen Prüfung:	17.04.2012

Teile dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3 Klinik	2
1.1.4 Pathologie	3
1.1.5 Genetik	4
<b>1.2 Das Ovarialkarzinom</b>	<b>5</b>
1.2.1 Epidemiologie	5
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren	5
1.2.3 Klinik	6
1.2.4 Pathologie	8
1.2.5 Genetik	9
<b>1.3 Apoptose und Caspasen</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Apoptoseresistenz als Mechanismus der Chemoresistenz</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Das Adhäsionsmolekül L1CAM</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2. Material</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Zelllinien</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Antikörper</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Zellkultur</b>	<b>18</b>
2.3.1 Medien und Medienzusätze	18
2.3.2 Materialien und Geräte für die Zellkultur	18
2.3.3 Substanzen für die Behandlung der Zellen	19
<b>2.4 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie</b>	<b>19</b>
2.4.1 L1CAM-Färbung	19
2.4.2 Annexin-V-FITC/PI-Färbung	20
<b>2.5 Caspase-3/-7-Assay</b>	<b>20</b>
<b>2.6 TUNEL-Assay</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Transfektion</b>	<b>21</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie</b>	<b>22</b>
3.2.1 Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	22
3.2.2 Färbung von L1CAM mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	23
3.2.2.1 Durchführung	23
3.2.3 Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid	24
3.2.3.1 Durchführung	24
<b>3.3 Caspase-3/-7-Assay</b>	<b>25</b>
3.3.1 Prinzip des Caspase-3/-7-Assays	25
3.3.2 Durchführung	25



<b>3.4</b>	<b>TUNEL-Assay</b>	<b>26</b>
3.4.1	Prinzip des TUNEL-Assays	26
3.4.2	Durchführung	27
<b>3.5</b>	<b>Verminderung der L1CAM Expression mittels siRNA</b>	<b>28</b>
3.5.1	Prinzip der siRNA	28
3.5.2	Durchführung	28
<b>3.6</b>	<b>Statistik</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Überprüfung der L1CAM-spezifischen Antikörper zur Detektion von L1CAM auf Tumorzelllinien</b>	<b>30</b>
4.1.1	PT45-P1res Zellen	31
4.1.2	Colo357 Zellen	32
4.1.3	OV-MZ-6 und Skov3ip	33
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung der Zytostatika-induzierten Apoptose in PDAC- und Ovarialkarzinomzelllinien unter Antikörper-vermittelter L1CAM-Blockade</b>	<b>35</b>
4.2.1	Bestimmung der Behandlungs-induzierten Apoptose mittels Caspase-3/-7-Assay	35
4.2.1.1	PT45-P1res Zellen	35
4.2.1.2	Colo357 Zellen	38
4.2.1.3	OV-MZ-6 Zellen	41
4.2.1.4	Skov3ip Zellen	43
4.2.2	Bestimmung der Behandlungs-induzierten Apoptose mittels TUNEL-Assay	45
4.2.2.1	PT45-P1res Zellen	45
4.2.2.2	Colo357 Zellen	47
4.2.3	Bestimmung der Behandlungs-induzierten Apoptose mittels Annexin-V-FITC/Propidiumjodid-Färbung	50
4.2.3.1	OV-MZ-6 Zellen	50
4.2.3.2	Skov3ip Zellen	51
<b>4.3</b>	<b>Vergleich des chemosensitivierenden Effektes der siRNA-vermittelten Suppression und der Antikörper-vermittelten Blockade von L1CAM</b>	<b>52</b>
4.3.1	PT45-P1res Zellen	53
4.3.2	Colo357 Zellen	54
4.3.3	OV-MZ-6 Zellen	55
4.3.4	Skov3ip Zellen	57
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>84</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>88</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>89</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das duktale Pankreasadenokarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Trotz weitreichender Fortschritte in der Therapie von Malignomen, stellt die Behandlung des dukталen Pankreasadenokarzinoms (PDAC) noch immer eine große Herausforderung dar. In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich im Schnitt 13000 Männer und Frauen an einem PDAC. Nach dem Kolon- und Magenkarzinom ist das PDAC der dritthäufigste gastrointestinale Tumor und die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer zwischen 5 und 7 % und für Frauen zwischen 3 und 8 % und verdeutlicht die äußerst ungünstige Prognose dieses Tumors [Husmann et al. 2010].

### **1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Der wichtigste Risikofaktor an einem PDAC zu erkranken, ist das Alter [Li et al. 2004]. Der Erkrankungsgipfel liegt jenseits des 60. Lebensjahres und Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr sind selten und weisen meist eine genetische Komponente auf. Als weitere gesicherte Risikofaktoren gelten zudem der langjährige Genuss von Tabak [Li et al. 2004] und Alkohol, chronische und lange bestehende Pankreatitiden sowie ein Diabetes mellitus [Hezel et al. 2006; Saur et al. 2006]. Adipositas und eine lipidreiche Ernährung scheinen ebenfalls das Risiko zu erhöhen [Saur et al. 2006], wohingegen eine Obst und Gemüse reiche Diät als risikomindernd angesehen wird [Lillemoe et al. 2000, Husmann et al. 2010]. Außerdem weisen Angehörige von Patienten mit einem PDAC ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf, wobei in ca. 10 % von einer hereditären Prädisposition ausgegangen wird [Saur et al. 2006]. Der Erbgang ist autosomal-dominant und die Penetranz altersabhängig. Als familiäre Syndrome mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an einem PDAC zu erkranken gelten die hereditäre Pankreatitis mit einer PRSS1-Mutation und die zystische Fibrose [Lillemoe et al. 2000; Saur et al. 2006]. Ferner weisen Patienten mit sogenannten „Krebssyndromen“, wie z.B. einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP), einem hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) oder einem Peutz-Jeghers-Syndrom ein erhöhtes Risiko auf, an einem PDAC zu erkranken [Hezel et al. 2006;

Saur et al. 2006]. Die Keimbahnmutation des BRCA2-Gens ist ebenfalls mit einer Erkrankungswahrscheinlichkeit verbunden [Lüttges, Klöppel 2005].

### 1.1.3 Klinik

Das PDAC zeichnet sich durch fehlende oder uncharakteristische Frühsymptome wie z.B. abdominelle Schmerzen und Appetit- und Gewichtsverlust aus. Als einzig richtungsweisendes Symptom führt der schmerzlose Ikterus als Zeichen einer extrahepatischen Gallengangsstenose zu einer raschen Diagnosestellung [Li et al. 2004, Saur et al. 2006]. Zu diesem Zeitpunkt sind allerdings schon 85-90 % aller PDACs nicht mehr resektabel, da das Erkrankungsbild durch eine ausgeprägte Infiltration in das umliegende Gewebe, organüberschreitendes Wachstum und einen frühzeitigen Einbruch in Lymph- und Blutgefäße mit Fernmetastasierung gekennzeichnet ist. Allein die radikale chirurgische Resektion stellt einen kurativen Heilungsansatz dar [Schneider et al. 2005]. In 10-15 % der Patienten erscheint eine potentiell kurative Resektion möglich, wobei die Prognose neben Kriterien wie organüberschreitendes Wachstum, Anwesenheit von Fernmetastasen und Gefäßeinbruch vor allem durch die Tumorgöße bei Diagnosestellung bestimmt wird [Saur et al. 2006]. Lediglich bei einer Tumorgöße kleiner als 2 cm kann die Prognose deutlich verbessert werden. Tumore im Kopfbereich werden mittels partieller oder pyloruserhaltender partieller Duodenopankreatektomie reseziert. Bei einer Tumorlokalisation im Korpus- oder Schwanzbereich gilt die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie als Standardverfahren [Lillemoe et al. 2000]. Um die immer noch schlechte Prognose zu verbessern, werden die Patienten nach erfolgreicher Resektion mit Gemcitabin adjuvant chemotherapiert. Neoadjuvante Chemotherapien mit dem Ziel eines *downstaging* des Tumors, um anschließend die R0-Resektionsrate zu verbessern, haben bisher keinen deutlich positiven Effekt gezeigt [Saur et al. 2006].

Bei der Mehrzahl der Patienten ist eine kurative Therapie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht mehr möglich, da sie ein lokal fortgeschrittenes oder bereits metastasiertes Tumorstadium aufweisen. Neben der symptomatischen Therapie durch Stentimplantation bei Gallengangskompression oder Anlagen von Gastroenterostomie- oder biliodigestiver Anastomosen bei Magenausgangsstenose und Verschlussikterus, stehen die Schmerztherapie und die palliative Chemotherapie im Vordergrund. Dabei gilt die Gemcitabin-Monotherapie momentan als *firstline*-Standardtherapie, verbessert bei einem Viertel der Patienten die

klinischen Allgemeinsymptome und führt zu einer medianen Überlebenszeit von ca. sechs Monaten [Eckel & Schmid 2006, Saur et al. 2006].

In den letzten Jahren ist aus dem Bereich der sogenannten *Biologicals* der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (Tarceva®) für die Behandlung des metastasierten PDAC dazugekommen. Allerdings führt Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin lediglich zu einem besseren Gesamtüberleben von 0,4 Monaten [Eckel et al. 2006, Gnad-Vogt et al. 2006] im Vergleich zur Therapie mit Gemcitabin allein. Auch die kombinierte Radiochemotherapie hat keinen Überlebensvorteil gegenüber der alleinigen Therapie mit Gemcitabin gezeigt [Li et al. 2004; Lüttges, Klöppel 2005; Saur et al. 2006].

Trotz der Weiterentwicklungen in der Behandlung des PDAC handelt es sich bei diesem Tumor noch immer um eine schlecht therapierbare Erkrankung, mit einer stadienunabhängigen schlechten Prognose, für die eine verbesserte Frühdiagnostik und neue, effektivere Therapieansätze dringend benötigt werden.

#### 1.1.4 Pathologie

Das Pankreas besteht zu 80 % aus den Zymogenen synthetisierenden und sezernierenden Azinus- und Gangzellen, die auch als exokrines Pankreas bezeichnet werden. Der endokrine Organanteil wird aus den Langerhansschen Inseln gebildet, die den Kohlenhydratstoffwechsel und die Glucosehomöostase regulieren [aus: Herold Innere Medizin 2010].

85 % der Pankreaskarzinome haben ihren Ursprung in den Gangstrukturen des Organs und werden daher auch als **Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)** bezeichnet, die überwiegend im Pankreaskopf lokalisiert sind und von dort aus die nachbarschaftlichen Strukturen infiltrieren. Charakteristisch für das PDAC ist ein festes desmoplastisches Stromagewebe [Lüttges, Klöppel 2005] bestehend aus Myofibroblasten und Proteinen der Extrazellulärmatrix.

Die histologische Untersuchung des PDAC ergibt in den meisten Fällen glanduläre und gangähnliche Strukturen. Gelegentlich wird auch kolloides, adenosquamöses oder sarkomatoides Gewebe gefunden. Nicht selten finden sich zudem in einem Tumor regionale Unterschiede bezüglich der Histologie und dem Tumor- und Differenzierungsgrad, wobei schon die kleinste Primärläsion eine perineurale und lymphovaskuläre Infiltration aufweist [Hezel et al. 2006].

Um ein zuverlässiges Früherkennungssystem zu entwickeln, ist ein umfassendes Verständnis über die Tumorgenese des PDAC von Nöten. Aus klinischen und histopathologischen Studien

sind bis dato drei Vorläuferläsionen des PDAC identifiziert worden (PanIN, MCN, IPMN) [Brügge et al. 2004; Maitra et al. 2005], von denen die **P**ankreatische **I**ntraepitheliale **N**eoplasie (PanIN) am besten erforscht ist und als Analogie zur Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms gilt. Untersuchungen von Pankreata aus Obduktionen und chirurgischen Resektionen haben in ca. 30 % eine PanIN gefunden, welches die Vorläuferläsion zu einem häufigen Befund beim älteren Menschen macht. Dennoch ist die Inzidenz der PanINs bei Patienten mit einem PDAC höher, sodass eine biologische Verbindung angenommen wird. Die schrittweise stattfindenden Gangveränderungen sind in drei Stadien klassifiziert worden. Die PanIN-1A-Läsion zeichnet sich durch einen Verlust des normalen kuboidalen Epithels aus, welches durch zylindrisches Epithel ersetzt wird. In der 1B-Läsion finden sich dagegen papilläre Strukturen. Das Stadium 2 ist durch eine Zellhyperplasie mit moderaten Kernatypien und einem Zellpolaritätsverlust gekennzeichnet. Die Hochrisiko-Läsion im Stadium 3 weist schwere Kernatypien auf, erfüllt die Kriterien eines *Carcinoma in situ* und gilt somit als obligate Präkanzerose [Lüttges, Klöppel 2005; Hezel et al. 2006]. Zusätzlich zu den histologischen Veränderungen ist die Umwandlung des normalen Pankreasgewebes durch eine zunehmende Anzahl von Genalterationen gekennzeichnet.

### 1.1.5 Genetik

Wie viele andere maligne Erkrankungen beruht auch das PDAC auf der Akkumulation erworbener Genmutationen. Ähnlich wie die histologische Umwandlung finden auch die genetischen Veränderungen nicht schlagartig, sondern schrittweise statt und sind somit nicht immer nachweisbar.

Eine der frühesten Genalterationen in der PanIN-Entwicklung betrifft das K-RAS Onkogen, welches unter anderem eine Rolle in der Proliferation, der Differenzierung und dem Überleben der Zellen spielt. Die Punktmutation in Kodon 12 des K-RAS Gens findet sich sporadisch in gesundem Pankreasgewebe, zu 30 % in den geringgradigen Läsionen, aber in nahezu allen fortgeschrittenen PDACs. Ebenfalls ist die Inaktivierung des p16-Tumorsuppressorgens in fast allen PDACs im Spätstadium nachweisbar [Li et al. 2004].

In mehr als 50 % der PanIN Läsionen im fortgeschrittenen Stadium mit signifikanten Zelldysplasien findet sich zusätzlich ein Verlust des p53 Tumorsuppressorgens [Li et al. 2004; Lüttges, Klöppel 2005; Hezel et al. 2006]. Normalerweise wird der Transkriptionsfaktor durch DNA-Schäden aktiviert, führt zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose und hemmt dadurch die Proliferation von Zellen mit prokarzinogenen chromosomalen Veränderungen.

Ebenfalls eine häufige Genalteration ist der Verlust des Tumorsuppressorgens SMAD4/DPC4, welches sich in gut der Hälfte der PDAC-Fälle, ebenfalls überwiegend im fortgeschrittenen Stadium, detektieren lässt [Li et al. 2004; Lüttges, Klöppel 2005; Hezel et al. 2006]. Die Bedeutung des SMAD4/DPC4-Verlustes in der Tumorgenese wird hauptsächlich durch seine Schlüsselrolle in der TGF- $\beta$ -vermittelten Wachstumsinhibition bestimmt.

## **1.2 Das Ovarialkarzinom**

### **1.2.1 Epidemiologie**

Inzidenz, Verlauf und Mortalität des Ovarialkarzinoms haben sich im Gegensatz zu anderen gynäkologischen Tumorerkrankungen in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert. Jährlich erkranken in Deutschland mehr als 9500 Frauen an einem Ovarialkarzinom und mehr als die Hälfte der Patientinnen (5500 Frauen) verstirbt an ihrem Tumorleiden. Das Ovarialkarzinom stellt somit nach dem Mammakarzinom mit 5,6 % aller Krebstodesfälle den häufigsten tödlich verlaufenden gynäkologischen Tumor dar.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt mit 35-49 % deutlich unter allen anderen gynäkologischen Krebserkrankungen [Husmann et al. 2010].

### **1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Obwohl nur in 5 % aller betroffenen Frauen eine genetische Prädisposition gefunden wird, ist eine positive Familienanamnese der wichtigste Risikofaktor für das Ovarialkarzinom. Ein weiterer starker Risikofaktor stellt die Nulliparität dar, wohingegen die langjährige Einnahme von Ovulationshemmern, Schwangerschaft und Laktation als Risiko mindernd betrachtet werden. Als weitere Risikofaktoren gelten Brustkrebserkrankungen in der Vorgeschichte, ein höherer sozioökonomischer Status und ein Alter über 40 Jahren [Cannistra 2004]. Durch Körperöffnungen eindringende und aszendierende Kanzerogene und Infektionen werden ebenfalls als Risikofaktoren, die Tubenligatur hingegen als prognostisch günstiger Faktor angesehen [Cannistra 2004].

Eine starke positive Familienanamnese für das Ovarialkarzinom und ein frühes Erkrankungsalter können auf eine Keimbahnmutation der DNA-Reparaturgene BRCA1 und BRCA2 hinweisen [King et al. 2003]. Das Lebenszeitrisko an einem Ovarialkarzinom zu

erkranken liegt für BRCA1-Mutationen auf Chromosom 17q bei 16-44 % [Struewing et al. 1997]. Trägerinnen der BRCA2-Mutation auf Chromosom 13q haben ein geringeres Erkrankungsrisiko von 10 % [Struewing et al. 1997]. Die Wahrscheinlichkeit an einem Mammakarzinom zu erkranken, beträgt bei beiden Mutationen zwischen 56 und 87 % [Struewing et al. 1997; Cannistra 2004].

Als weiteres familiäres Syndrom, das mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Neoplasien des Ovars verbunden wird, gilt das Lynch Syndrom 2 (HNPCC = *hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma*), bei dem eine Keimbahnmutation der DNA *mismatch repair*-Gene MSH2 oder MLH1 vorliegt [Chung et al. 2003].

### 1.2.3 Klinik

Die Problematik des Ovarialkarzinoms liegt unter anderem an fehlenden oder unspezifischen Frühsymptomen. Kleine Tumore im Frühstadium werden meist als Zufallsbefund bei gynäkologischen Untersuchungen entdeckt, da sie nur geringe bis keine Symptome verursachen. Gelegentlich klagen die Patientinnen über uncharakteristische Druckgefühle oder Schmerzen im Becken. In mehr als der Hälfte der Fälle liegt bei Diagnosestellung schon eine Peritonealkarzinose in Verbindung mit Aszites vor, da überwiegend erst das verdrängende und infiltrative Wachstum in die benachbarten Organe und in den Oberbauch zu Symptomen führt [Cannistra 2004]. Das Kardinalsymptom des Ovarialkarzinoms im fortgeschrittenen Stadium ist eine Tumorkachexie mit Facies ovarica und ein durch Tumor und Aszites aufgetriebenes Abdomen. Das Ovarialkarzinom metastasiert typischerweise in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten und im weiteren Verlauf auch hämatogen in Leber, Knochen und Lunge [Cannistra 2004].

Der einzige kurative Heilungsansatz bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ist die radikale operative Tumoresektion. In der Regel wird eine totale abdominale Hysterektomie und bilaterale Salpingoophorektomie mit Entfernung des pelvinen Peritoneums und des infra- und suprakolischen Netzes sowie eine Peritoneallavage durchgeführt. Tumorbefallene Organanteile und Peritonealmetastasen werden dabei ebenfalls reseziert [Pomel et al. 2007]. Bei einer intraperitoneal weitgehenden Tumorreduktion ist die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie sinnvoll. Bei Tumoren, die nur auf die Ovarien begrenzt erscheinen, wird zudem eine Lymphknotenbiopsie durchgeführt. Ziel dieser radikalen Vorgehensweise ist es, auch bei fortgeschrittenen Karzinomen Tumorfreiheit oder eine weitgehende Tumorreduktion

zu erreichen, da der postoperativ verbleibende Tumorrest den wichtigsten Prognoseparameter darstellt [Bristow et al. 2002; Harter et al. 2006].

Ab einem Tumorstadium FIGO 1C muss auch nach radikaler Tumoresektion mit großer Wahrscheinlichkeit von verbliebenen proliferationsfähigen Tumorzellen ausgegangen werden. Um das Rezidivrisiko zu senken, ist daher die Mehrheit der Patientinnen auf eine adjuvante Chemotherapie angewiesen. Als Therapie der ersten Wahl in einem frühen Tumorstadium hat sich Carboplatin bzw. Cisplatin zur Senkung des Rezidivrisikos durchgesetzt. Der Goldstandard für höhere Tumorstadien ist momentan Carboplatin bzw. Cisplatin in Kombination mit Paclitaxel [Aebi, Castiglione 2008]. Mehr als 50 % der betroffenen Frauen erleben unter der Kombinationstherapie eine Remission. Zudem führen die Platin-Analoga in Kombination mit Taxanen bei Patientinnen mit einer Resttumorgröße von über einem Zentimeter zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um 12 Monate [Cannistra 2004]. Ein Rezidiv oder eine primäre Progression innerhalb eines Jahres nach Abschluss der Ersttherapie weist auf eine Platin-Resistenz hin und erfordert eine Therapie mit Etoposid, Gemcitabin oder liposomalem Doxorubicin. Bei Auftreten eines Spätrezidivs wird eine Revisionsoperation durchgeführt und mit der Erstchemotherapie noch ein weiteres Mal adjuvant therapiert [Aebi, Castiglione 2008].

Obwohl kein signifikanter Unterschied im Frühstadium zwischen Chemotherapie und Radiotherapie in Bezug auf progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben besteht, ist die Strahlentherapie weitgehend durch die Zytostatikatherapie ersetzt worden. Gelegentlich wird die Strahlentherapie noch zur Behandlung lokal begrenzter Tumorreste und Tumorrezidive oder palliativ zur Analgesie bei Knochenmetastasen eingesetzt [Winter- Roach et al. 2003].

Das Auftreten eines Rezidivs ist ein großes Problem in fortgeschrittenen Tumorstadien, da generell nicht mehr von einem kurativen Heilungsansatz ausgegangen werden kann und somit den Einsatz einer palliativen Therapie zur Symptomlinderung und Prävention von Komplikationen erfordert. Rezidivierende Aszitesbildung sollte punktiert werden und eine auftretende Darmbeteiligung in Form eines Ileus erfordert die Anlage eines künstlichen Darmausgangs [Cannistra 2004]. Des Weiteren kann durch eine Hormontherapie mit Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren eine Symptomlinderung erreicht werden [Markman et al. 1996; Bowman et al. 2002].

Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist stadienabhängig und wird maßgeblich durch den Durchmesser des Resttumors bestimmt [Bristow et al. 2002; Harter et al. 2006]. In einem frühen Tumorstadium (Stadium 1) liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 70 und 80 % und fällt im Stadium 2 auf 55 % ab. Bei einem fortgeschrittenen Tumorstadium 3



überleben nur noch ein Viertel der Patientinnen die ersten fünf Jahre und bei einem verbleibenden Tumor größer als 1 cm im Durchmesser beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 10 % [Young et al. 1990; McGuire et al. 1996; aus: Gynäkologie und Geburtshilfe 2005].

Obgleich sich die Therapie des Ovarialkarzinoms in den letzten Jahren verbessert hat, erleiden noch immer 2/3 der Patientinnen nach Therapieabschluss ein Rezidiv und versterben an den Komplikationen ihres Tumorleidens. Das unbefriedigende Gesamtüberleben macht eine Weiterentwicklung der bisherigen und das Erforschen neuer Therapiemöglichkeiten unentbehrlich.

#### 1.2.4 Pathologie

Das Ovar erfüllt reproduktive und endokrine Funktionen und besteht aus Oberflächenepithel, Stroma inklusive Keimstrangabkömmlingen und Keimzellen. 70 % der Ovarialtumore weisen eine epitheliale Differenzierung auf und werden nach den Zelltypen des sekundären Müller-Systems in seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige und transitionalzellige Tumore eingeteilt [Shih, Kurman 2004; Staebler et al. 2007]. Obwohl die Mehrheit der Neoplasien benigne oder mit unsicherer Dignität (sog. Borderline-Tumore) ist, gilt den malignen Läsionen aufgrund ihres dramatischen Verlaufs besondere Aufmerksamkeit.

Seröse Adenokarzinome repräsentieren die größte Gruppe der malignen Neoplasien des Ovars [Seidman et al. 2004] und imponieren makroskopisch meist als relativ große Tumore mit sowohl zystischen als auch soliden Komponenten. In der histologischen Untersuchung findet sich papilläres, drüsiges oder solides Tumorzellwachstum [Kurman, Shih 2010].

Dank systematischer mikroskopischer und klinischer Analysen epithelialer Ovarialtumore und aufgrund molekulargenetischer Fortschritte ist es in den letzten Jahren gelungen, für die Pathogenese der Ovarialtumore ein dualistisches Modell zu entwickeln, in dem die epithelialen Oberflächentumore in Typ 1 und Typ 2 Tumore eingeteilt werden und mit unterschiedlicher Tumorgenese assoziiert werden [Shih, Kurman 2004]. Für die Typ 1 Tumore, zu denen *low-grade* seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige und transitionalzellige Karzinome gehören, wird eine schrittweise Entwicklung von Vorläuferläsionen über Borderline-Tumore bis hin zu invasiven Karzinomen angenommen [Kurman, Shih 2004; Shih, Kurman 2010]. Als gut bekannte Vorläuferläsionen für die *low-grade* serösen und muzinösen Karzinome gelten die Zystadenome, wohingegen die Endometriose als Vorläufer des endometrioiden und klarzelligen Tumors angenommen wird.

[Shih, Kurman 2004]. Des Weiteren zeichnen sich Typ 1 Tumore durch lange klinische Verläufe, eine niedrige Proliferationsrate und geringe bis mäßiggradige Kernpleomorphien aus.

Im Gegensatz zu dieser schrittweisen Entwicklung wird für das *high-grade* seröse Karzinom als Prototyp der hochmalignen Typ 2 Tumore eine *De-novo*-Entstehung aus einzelnen transformierten Zellen des Oberflächenepithels ohne Vorläuferläsionen postuliert [Shih, Kurman 2004; Staebler, Diebold 2007]. Histopathologisch weist dieser Tumorsubtyp ein weites morphologisches Spektrum auf, aber als charakteristischste Merkmale gelten das hochgeschichtete, zum Teil fenestrierte Epithel, vereinzelte mononukleäre Riesenzellen, prominente Nukleoli und eine hohe Apoptoserate mit zahlreichen *apoptotic bodies* [Gilks, Prat 2009].

Das dualistische Progressionsmodell gilt als Versuch, die Pathogenese des Ovarialkarzinoms zu erklären und obwohl es nicht als einzige Möglichkeit anzusehen ist, wird es durch molekulargenetische Ergebnisse mittlerweile stark gestützt [Staebler, Diebold 2007].

### 1.2.5 Genetik

Auf molekulargenetischer Ebene lassen sich einige Alterationen zur spezifischen Differenzierung zwischen Typ 1 und Typ 2 Tumoren nachweisen. Sehr früh in der Tumorgenese der Typ 1 Tumore finden sich Mutationen der BRAF oder KRAS Onkogene, die über die Aktivierung der RAS, RAF, MEK, ERK und MAP-Kaskaden die neoplastische Umwandlung fördern [Shih, Kurman 2003; Cho, Shih 2009]. BRAF und KRAS Mutationen lassen sich in insgesamt 65 % der Typ 1 Tumore und in 61 % ihrer putativen Vorläufer nachweisen, wohingegen sie nicht in Typ 2 Tumoren zu finden sind [Shih, Kurman 2003]. Im Gegensatz dazu finden sich Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 fast ausschließlich und zu 50-80 % in *high grade* serösen Karzinomen [Kurman, Shih 2010]. Typisch für Typ 2 Tumore ist die daraus resultierende chromosomale Instabilität [Staebler, Diebold 2007]. Ähnlich wie beim Mammakarzinom weist auch das *high grade* seröse Karzinom in einigen Fällen Keimbahnmutationen der BRCA1 oder BRCA2-Gene und eine Überexpression des Her-2/neu Rezeptors auf [Shih, Kurman 2004; Gilks, Prat. 2009]. Als kritisches Onkogen für die Entwicklung des serösen Ovarialkarzinoms wurde außerdem das PAK<sub>1</sub>-Gen identifiziert [Staebler, Diebold 2007]. Darüber hinaus wird eine höhere Gesamtzahl an chromosomalen Aberrationen mit einem höheren Tumorgrad und einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert.

### 1.3 Apoptose und Caspasen

In einem gesunden Organismus wird die Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod durch Apoptose (programmierter Zelltod) aufrechterhalten. Überzählige oder pathologische Zellen werden durch den genetisch determinierten Prozess der Apoptose ohne begleitende Entzündungsreaktion beseitigt. Defekte im Apoptoseprogramm sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Neurodegenerative Erkrankungen beruhen u.a. auf einer gesteigerten Apoptose, wohingegen Neoplasien durch verminderte Apoptose entstehen.

Als früheste Veränderung während des programmierten Zelltods wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran an die Zelloberfläche verlagert und dient dort als Apoptosesignal. In Folge dessen kommt es zu den charakteristischen Zellveränderungen der Apoptose wie Pyknosis, Karyohexis, Bildung von *apoptotic bodies* und DNA-Fragmentierung [Kroemer, Martin 2005]. Schließlich werden die *apoptotic bodies* von phagozytierenden Zellen erkannt und internalisiert [Vermeulen et al. 2005].

Verantwortlich für die proteolytische Spaltung zellulärer Proteine, die zu den charakteristischen apoptotischen Merkmalen führen, ist das kaskadenartig aktivierbare System von Caspasen. Diese Proteasen haben Cystein im aktiven Zentrum und spalten ihr Zielprotein nach Aspartat [Hengartner 2000].

Caspasen werden als inaktives Vorläuferprotein (Procaspase) exprimiert und bestehen aus einer Prodomäne und einer kleinen und großen Untereinheit. Die aktive Form entsteht durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne durch andere Caspasen oder Procaspasen und wird durch die Untereinheiten gebildet [Raff 1998].

Die Hälfte der 14 bekannten humanen Caspasen ist in der Apoptose involviert und wird unterteilt in Initiator- und Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10) besitzen an ihrer langen Prodomäne eine Sequenz zur Interaktion mit Adaptorproteinen und aktivieren proteolytisch die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) mit kurzen Prodomänen. Ungleich der Initiatorcaspasen verfügen die Effektorcaspasen nicht über eine autokatalytische Aktivität [Kroemer, Martin 2005].

Die Initiierung der Apoptose kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, wobei prinzipiell zwischen externer und interner Aktivierung unterschieden wird. Der externe Weg setzt die Bindung von Todesliganden (z.B. CD95L, Trail, TNF- $\alpha$ ) an die extrazelluläre Domäne des entsprechenden Todesrezeptors voraus [Vermeulen et al. 2005], wohingegen der interne Weg über die intrazellulären Mitochondrien initiiert wird. Intrazelluläre Apoptosesignale wie Zellschädigung durch Zytostatika, Mangel an Wachstumsfaktoren oder

Verlust der Zell-Zell-Interaktion führen zu einer direkten Cytochrom-C Freisetzung aus den Mitochondrien, wobei die Proteine der Bcl-2-Familie als Regulator fungieren [Hengartner 2000].

Binden Todesliganden an ihre entsprechenden, zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehörenden, Todesrezeptoren (CD95, Trail-Rezeptor, TNF- $\alpha$ -Rezeptor) wird intrazellulär ein Todessignal-induzierender Komplex (DISC) gebildet, der über das FADD-Adaptormolekül multiple Procaspase-8-Moleküle rekrutiert [Hengartner 2000]. Die Vielzahl der Vorläufermoleküle führt über *induced proximity* zur autokatalytischen Aktivierung. In Abhängigkeit vom Zelltyp ist zur Amplifikation des Apoptosesignals noch die intrinsische Aktivierung über die Mitochondrien erforderlich. Dabei werden durch Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, die Mitochondrien aktiviert. Dazu transloziert das durch Caspase-8 gespaltene Bid in die Mitochondrien und führt dort zur Freisetzung von Cytochrom-C ins Zytoplasma. Cytochrom-C wiederum bildet mit Apaf-1, ATP und der Procaspase-9 das Apoptosom. Die Procaspase wird im Apoptosom proteolytisch gespalten und aktiviert die Effektorcaspasen [Hengartner 2000]. Die nachfolgende Spaltung führt zu den bereits genannten morphologischen Charakteristika apoptotischer Zellen.

#### **1.4 Apoptoseresistenz als Mechanismus der Chemoresistenz**

Chemo- und Radiotherapien üben ihre tumorschädigende Wirkung im Wesentlichen über den Mechanismus der Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition in ihren Zielzellen aus.

Während Gemcitabin und 5-Fluorouracil als Pyrimidinbasenantagonisten und Etoposid als Hemmstoff der Topoisomerase II über eine Störung der DNA-Synthese zum Zelltod führen, üben Paclitaxel und Cisplatin ihre zytotoxische Wirkung vor allem in der G<sub>2</sub>- und M-Phase der Mitose aus [Lage, Denkert 2007].

Neben einer erhöhten Detoxifikation und Ausschleusung der Zytostatika stellt die Dysregulation apoptotischer Signalwege einen wesentlichen Mechanismus in Tumorzellen dar, sich der Wirkung von Zytostatika zu entziehen [Westphal, Kalthoff 2003; Vermeulen et al. 2005].

Mutationen im pro-apoptotischen Tumorsuppressorgen p53 und eine veränderte Proteinexpression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie zählen dabei zu den häufigsten Veränderungen in Karzinomen [Vermeulen et al. 2005]. In gesunden Zellen reguliert p53 über den Zellzyklusarrest und die Aktivierung Apoptose-induzierender Proteine wie z.B. Bax, Apaf-1 und Caspase-9 das Zellwachstum [Vermeulen et al. 2005]. Generell können

Mutationen Apoptose-regulierender Gene ihre inhibitorischen und anti-apoptotischen Effekte an verschiedenen Stellen der Apoptosekaskade ausüben. Als Inhibitoren der Todesrezeptor-induzierten Apoptose konkurrieren FLIP<sub>L</sub> (*FADD-like ICE inhibitory protein, long form*) und FLIP<sub>S</sub> (*short form*) mit den Procaspasen-8 und -10 um die Rolle im DISC und hemmen dadurch die Aktivierung der Caspase-8 bzw. Caspase-10 [Westphal, Kalthoff 2003; Fulda, Debatin 2006]. Weiter distal in der Kaskade üben Mitglieder der *inhibitors of apoptosis (IAP)*-Familie ihre Wirkung aus. Survivin, c-IAP-1, c-IAP-2 und XIAP als Vertreter der IAPs binden und inhibieren direkt Caspase-3 und -7. Die Überexpression von solchen potenten Caspase-Inhibitoren ist häufig in Tumorzellen zu finden und kann erheblich zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli beitragen [Westphal, Kalthoff 2003; Vermeulen et al. 2005].

Zwei weitere potentielle anti-apoptotische Signaltransduktionswege, denen eine Rolle in der Vermittlung von Chemoresistenz zugesprochen wird, sind der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K)/Akt- und der *Nuclear factor-kappa B (NF-κB)*-Signalweg. Über ein Integringeflecht bindet PI3-K an die fokale Adhäsionkinase und führt dadurch zu der Aktivierung der spezifischen Kinase Akt. Indem es die Expression der Transkriptionsfaktoren FOXO und p53 reguliert, kann Akt zu einer Inhibition der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie wie z.B. BAD, Bim, Puma und Noxa führen [Westhoff, Fulda 2009]. Darüber hinaus kann der PI3-K Signalweg direkt inhibierend auf Caspase-9 wirken und darüber zu einer verstärkten DNA-Reparatur führen [Westphal, Kalthoff 2003; Westhoff, Fulda 2009].

NF-κB ist im Zytoplasma an inhibitorische Proteine gebunden. Verschiedene Stimuli führen über eine Aktivierung des *Inhibitor κB Kinase (IKK)*-Komplexes zur NF-κB Freisetzung und nachfolgender Regulierung der Genexpression im Nukleolus [Arlt et al. 2003]. Eine konstitutive Aktivierung von NF-κB wurde in verschiedenen Tumorentitäten, u.a. im PDAC, mit Apoptose- und Chemoresistenz sowie einem malignen Phänotyp assoziiert [Arlt et al. 2001, 2002, 2003], wobei die autokrine Interleukin-1beta (IL-1β)-Produktion als ein wesentlicher Induktor der konstanten NF-κB-Aktivität identifiziert wurde [Arlt et al. 2002; Muerköster et al. 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der NF-κB-Aktivität direkt oder durch Inhibition der IL-1β-Signaltransduktion zu einer verstärkten Apoptoseinduktion nach Zytostatikagabe *in vitro* und *in vivo* führt [Arlt et al. 2001; Muerköster et al. 2003]. Jüngste Untersuchungen weisen auf eine Verknüpfung von NF-κB bzw. IL-1β und dem Adhäsionsmolekül L1CAM (s.u.) in der Vermittlung von Chemoresistenz von Tumorzellen hin [Kiefel et al. 2010].

So scheint die Bindung von  $\alpha 5$ -Integrin und  $\alpha v$ -Integrin an L1CAM notwendig für die nachfolgende IL-1 $\beta$ -vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung zu sein [Sebens Mürköster et al. 2009; Kiefel et al. 2010].

Weiterhin von Bedeutung für die Vermittlung von Chemoresistenz sind Signale, die über Zell-Matrix-Interaktionen aktiviert werden, wobei dem MAPK (*mitogen activated protein kinase*)/ ERK (*extracellular regulated kinase*) Signalweg und PI3-K/Akt Signalweg die größte Bedeutung zukommt [Westhoff, Fulda 2009].

Ein initiiertes Signal, bestehend aus einem Integrin-Cluster oder einer Wachstumsfaktor-vermittelten Rezeptoraktivierung, wird in ein Adaptorprotein umgewandelt [Barberis et al. 2000], um anschließend mit Guanin Nukleotid Austauschfaktoren interagieren zu können. Über die GTPase Ras werden die MAP-Kinasen bzw. MEKs aktiviert, die wiederum zu einer Translokation von MAPK und ERK in den Nukleus führen. Über eine veränderte Proteinexpression der Bcl-2-Familie vermittelt der MAPK/ERK Signalweg zelluläre Überlebenssignale. So kann Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) entweder indirekt über die ERK-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO reguliert [Yan et al. 2008] oder direkt abgebaut werden [Weston et al. 2003]. Des Weiteren führt eine ERK-Inhibierung zu einer Herunterregulierung anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie, wobei in Bezug auf das PDAC insbesondere Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Mcl-1 zu nennen sind [Boucher et al. 2008].

## 1.5 Das Adhäsionsmolekül L1CAM

Eine häufige Veränderung in malignen Tumoren stellen dysregulierte Zelladhäsionsmoleküle dar. Verluste der Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Adhäsion begünstigen die Tumorprogression und Metastasierung. Eines dieser Zelladhäsionsmoleküle ist L1CAM (CD171), ein Typ I-Membranglykoprotein der Ig-Superfamilie. Es besteht aus einer Extrazellulärregion bestehend aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen und fünf Fibronectin Typ III-Wiederholungen gefolgt von einer Transmembransequenz und einer zytoplasmatischen Domäne. Ursprünglich wurde L1CAM im Nervensystem entdeckt, wo ihm eine Schlüsselrolle in der neuronalen Entwicklung, der Regulierung der Zell-Zell-Interaktionen und in der neuronalen Migration zugeschrieben wird [Raveh et al. 2009].

Neben der physiologischen Expression im neuronalen System wird L1CAM in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem im Ovarialkarzinom und im PDAC stadienabhängig überexprimiert und korreliert häufig mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer

schlechten Prognose [Fogel et al. 2003a; Raveh et al. 2009]. Untersuchungen haben gezeigt, dass L1CAM im PDAC in 92 % aller untersuchten Gewebe exprimiert wird [Sebens Mürköster et al. 2007; Bergmann et al. 2010]. Ferner kann lösliches L1CAM in 79 % aller Fälle in Serum und Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom detektiert werden [Fogel et al. 2003], jedoch nicht in Seren von PDAC-Patienten [Bergmann et al. 2010]. Darüber hinaus wurde L1CAM bereits in Gangzellen chronischer Pankreatitiden detektiert. [Geismann et al. 2009]. Als ein wesentlicher Induktor des tumorösen L1CAM konnte der *Transforming Growth Factor-beta1* (TGF- $\beta$ 1) [Geismann et al. 2010] sowie IL-1 $\beta$  [Sebens Mürköster et al. 2007] identifiziert werden, welche beide von Stromazellen aber auch endogen von den Tumorzellen freigesetzt werden können. Durch die Beeinflussung verschiedener Prozesse, die zur Tumorprogression beitragen, spielt L1CAM eine wichtige Rolle bei Krebserkrankungen, wobei sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Domäne involviert zu sein scheinen [Mechtersheimer et al. 2001; Gutwein et al. 2005; Raveh et al. 2009].

Über den extrazellulären Anteil kann das Adhäsionsmolekül homophile Bindungen mit L1CAM auf derselben Zelle oder auf Nachbarzellen eingehen. Heterophile Interaktionen von L1CAM mit Tyrosinkinase-Rezeptoren (*Fibroblast growth factor receptor*) und verschiedenen Integrinen (z.B.  $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1) können durch Phosphorylierung zu einer Erk 1/2-Aktivierung und in dessen Folge zu einer Erk-regulierten Expression von Transkriptionsfaktoren und Apoptose-regulierenden Genen führen [Raveh et al. 2009]. Zusätzlich trägt die Erk-Aktivierung durch Hemmung der Caspasen und der damit einhergehenden Apoptoseinhibition zur Tumorprogression bei. Zusätzlich kann die erhöhte L1CAM-Expression zu einer Hochregulation von Bcl-2 führen [Stoeck et al. 2007].

Neben der membrangebundenen Form kann L1CAM auch als lösliche Form vorliegen (s.o.). Diese Spaltung kann durch die Metalloproteasen ADAM-10 und ADAM-17 oder durch Plasmin entstehen [Nayeem et al. 1999; Mechtersheimer et al. 2001; Maretzky et al. 2005]. Die abgetrennte Ektodomäne spielt ebenfalls eine Rolle in der Progression von zahlreichen Tumoren und trägt zu einer erhöhten Motilität und Invasivität von z.B. Ovarialkarzinomzellen oder Kolonkarzinomzellen bei [Mechtersheimer et al. 2001; Gavert et al. 2007]. Durch Abspaltung des extrazellulären Anteils entsteht ein membrangebundenes C-terminales L1CAM-Fragment (L1-32). Dieses ADAM-10-Spaltprodukt wird durch die  $\gamma$ -Sekretase weiterprozessiert und transloziert in den Nukleus [Maretzky et al. 2005], wo es zur Hochregulation der Transkriptionsfaktoren HOX A9 und AP2 $\alpha$  sowie verschiedener Gene wie Cathepsin B und  $\beta$ 3-Integrin, aber auch zur Herunterregulation Apoptose-induzierender Gene führen kann [Stoeck et al. 2007; Gast et al. 2008]. Darüber hinaus kann lösliches wie auch

membrangebundenes L1CAM durch Bindung an Integrine die Aktivierung von Erk induzieren und darüber zur Hochregulation von Bcl-2 führen.

Abgesehen von der Vermittlung von Zellproliferation, Migration, Invasivität und Metastasierung der Karzinomzellen, kommt L1CAM eine große Bedeutung in der Vermittlung von Apoptoseschutz und Chemoresistenz zu. So konnte gezeigt werden, dass es durch Langzeitbehandlung mit dem Zytostatikum Etoposid in der PDAC-Zelllinie PT45-P1res zu einer verstärkten IL-1 $\beta$ -abhängigen L1CAM-Expression kommt, die wiederum zu einer Induktion der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) führt. Die nachfolgende NO-Freisetzung resultiert in einer Nitrosylierung von Caspasen und geht einher mit einer verminderten Apoptoseantwort auf Zytostatika [Sebens Mürköster et al. 2006, 2007]. Hier scheint die Bindung von L1CAM an  $\alpha$ 5-Integrin von essentieller Bedeutung zu sein [Sebens Mürköster et al. 2009]. Bis dato ist allerdings noch unklar, ob das anti-apoptotische Signal von L1CAM oder dessen Ligand ausgeht. Weitere Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten nachweisen, dass PDAC-Zelllinien nach Cokultur mit Myofibroblasten und solche, die bereits endogen über eine hohe L1CAM-Expression verfügen wie z.B. Panc1 und Colo357 Zellen, ebenfalls eine L1CAM-abhängige Chemoresistenz aufweisen. So resultierte die Unterbindung der L1CAM-Expression mittels siRNA in einer gesteigerten Apoptoseinduktion nach Zytostatikagabe [Sebens Mürköster et al. 2006; Geismann et al. 2009].

Diese Daten untermauernd konnte gezeigt werden, dass L1CAM-exprimierende Ovarialkarzinomzelllinien resistent gegenüber Behandlungen mit dem Zytostatikum Cisplatin sind. Eine Verminderung der L1CAM-Expression mittels siRNA-vermitteltem *knockdown* in der Ovarialkarzinomzelllinie OV-MZ-6 führte zu einer signifikant erhöhten Apoptosesensitivität gegenüber verschiedener Stimuli [Stoeck et al. 2007]. Darüber hinaus führte die Behandlung der L1CAM-exprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien SKOV3ip und OV-MZ-6 mit einem anti-L1CAM-Antikörper sowohl zu einer signifikanten Verringerung der Zellmigration *in vitro* als auch zu einer Hemmung des Tumorwachstums, der Disseminierung und Aszitesbildung *in vivo* [Arlt et al. 2006].

Aufgrund der Tatsache, dass L1CAM in verschiedenen Prozessen der Tumorgenese, u.a. in der Vermittlung von Chemoresistenz, eine zentrale Rolle einnimmt, stellt es eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur in der Behandlung von Malignomen dar.



## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Sowohl das PDAC als auch das Ovarialkarzinom sind durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika charakterisiert. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Resistenzmechanismen beschrieben worden, unter anderem ein erhöhter Schutz vor Apoptoseinduktion. Das Adhäsionsmolekül L1CAM scheint in PDAC- sowie in Ovarialkarzinomzellen maßgeblich an der Apoptoseresistenz und damit zur Ausbildung eines chemoresistenten Phänotyps dieser Tumorzellen beteiligt zu sein. Eine Strategie, um das apoptotische Ansprechen von Tumorzellen auf Zytostatika zu verbessern, stellt daher die Unterdrückung der L1CAM-Expression beziehungsweise die Blockade von L1CAM mittels blockierender Antikörper dar.

Ziel dieser Arbeit war es, vier verschiedene L1CAM-spezifische Antikörper auf ihre chemosensitivierende Wirkung an Zelllinien von zwei Tumorentitäten *in vitro* zu überprüfen. Als Modellzelllinien für das PDAC wurden die L1CAM-exprimierenden Zelllinien PT45-P1res und Colo357 und für das Ovarialkarzinom die Zelllinien Skov3ip und OV-MZ-6 verwendet.

Die vier L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3, L1-38.12, L1-35.9 und L1-14.10 wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml) in Kombination mit einem Zytostatikum im Vergleich zu einer Zytostatikatherapie allein auf ihr chemosensitivierendes Potential evaluiert. Zur chemotherapeutischen Behandlung der PDAC-Zelllinien wurden Etoposid und die Standardzytostatika Gemcitabin und 5-Fluorouracil eingesetzt. Die Ovarialkarzinomzellen wurden mit den in der Klinik standardmäßig verwendeten Zytostatika Paclitaxel und Cisplatin behandelt.

Als *Readout*-Verfahren zur Messung der Apoptoseinduktion wurde ein Caspase-3/-7-Assay durchgeführt. Als zweite unabhängige Nachweismethode wurde bei den PDAC-Zelllinien der TUNEL-Assay verwendet und bei den Ovarialkarzinomzelllinien wurde eine Annexin-V-FITC/PI-Färbung durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Grundlage dar, um zwei Antikörper, die in dieser Untersuchung die stärkste chemosensitivierende Wirkung zeigen, in tierexperimentellen Versuchen auf ihre klinische Nutzbarkeit zu validieren.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Histologie &amp; Differenzierung</b>	<b>Referenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>PDAC-Zelllinien</b>				
Colo357	Lymphknoten-metastase	PDAC G1- G2	R. Morgan USA	Prof. H. Kalthoff; Institut für Experimentelle Krebsforschung; UKSH Campus Kiel
PT45-P1res	Primärtumor	PDAC G3	H. Kalthoff Deutschland	Prof. S. Sebens; Institut für Experimentelle Medizin; CAU Kiel
<b>Ovarialkarzinomzelllinien</b>				
OV-MZ-6	Aszites	Adenokarzinom	V. Möbus Deutschland	Prof. P. Altevogt; DKFZ Heidelberg;
Skov3ip	Aszites	Adenokarzinom	E. Vitetta USA	Abteilung für Translationale Immunologie

## 2.2 Antikörper

Primärantikörper	Spezifität/ Spezies/Isotyp	L1CAM- Bindungsstelle	Bezugsquelle
L1-9.3	human L1CAM/ Maus /IgG1	1. Ig-Domäne	Hergestellt und zur Verfügung gestellt durch Dr. Gerhard Moldenhauer DKFZ Heidelberg; Abteilung für Translationale Immunologie
L1-38.12		1. Ig-Domäne	
L1-14.10		3. Ig-Domäne	
L1-35.9		6. Ig-Domäne	
Kontrolle	Maus IgG1	keine	R&D Systems, Wiesbaden
<b>Sekundärantikörper</b>			<b>Bezugsquelle</b>
Alexa488- konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG			Invitrogen, Karlsruhe

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Medien und Medienzusätze

DMEM high glucose Medium	PAA Laboratories, Cölbe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories, Cölbe
Natriumpyruvat 100 mM	PAA Laboratories, Cölbe
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Cölbe

### 2.3.2 Materialien und Geräte für die Zellkultur

Brutschrank CO <sub>2</sub> - Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Gasbrenner	Integra Biosciences, Schweiz
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Pasteurpipette Glas 230 mm	Assistent, Sondheim
Pipet-Boy	Integra Biosciences, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Saugpumpe	
Sterilbank	Kendro, Langenselbold
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Trypsin/EDTA 1×	PAA Laboratories, Cölbe
Zellkulturflasche 75 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

### 2.3.3 Substanzen für die Behandlung der Zellen

Cisplatin	Hexal, Holzkirchen
Etoposid	Bristol-Myers Squibb, München
5-Fluorouracil	Ribosepharm GmbH, Gräfelfing
Gemcitabin	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg
Paclitaxel	Bristol-Myers Squibb, München
Alle Zytostatika wurden von der Apotheke des UK-SH, Campus Kiel in 0,9 % NaCl gelöst und verdünnt.	

## 2.4 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer Galaxy Argon Plus	Dako Cytomation, Hamburg
Software Flomax	Dako Cytomation, Hamburg

### 2.4.1 L1CAM-Färbung

Brutschrank CO2- Inkubator BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
BSA	Serva, Heidelberg
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Pipet-Boy	Integra Biosciences, Schweiz
Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 3,5 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Saugpumpe	
Schüttler Tumbling Tabel	Biometra, Göttingen

Serologische Pipette 5 ml  
 Sheath Puffer  
 Sterilbank  
 Trypsin/EDTA 1×  
 Zentrifuge Labofuge Function Line 400

Sarstedt, Nümbrecht  
 Dako Cytomation, Hamburg  
 Kendro, Langenselbold  
 PAA Laboratories, Cölbe  
 Heraeus Instruments, Hanau

#### **2.4.2 Annexin-V-FITC/PI-Färbung**

Annexin-V Binding Puffer 1×  
 Annexin-V FITC  
 Dead Cell Discriminator (Propidium Jodid)  
 Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe  
 PBS  
 Pipette  
 Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 500 µl  
 Röhrchen 3,5 ml, 15 ml  
 Saugpumpe  
 Sheath Puffer  
 Trypsin/EDTA 1×  
 6-Well-Platte  
 Zentrifuge Labofuge Function Line 400

Becton Dickinson, Heidelberg  
 Becton Dickinson, Heidelberg  
 Caltag Laboratories, Hamburg  
 Omnilab, Hamburg  
 PAA Laboratories, Cölbe  
 Eppendorf, Hamburg  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
  
 Dako Cytomation, Hamburg  
 PAA Laboratories, Cölbe  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen  
 Heraeus Instruments, Hanau

#### **2.5 Caspase-3/-7-Assay**

Caspase-Glo 3/7-Assay  
 Luminometer Micro Lumat Plus  
 PBS  
 Röhrchen 3, 5 ml, 15 ml  
 Transferpipette 3,5 ml  
 Trypsin/EDTA 1×  
 12-Well-Platte  
 96-Well-Platte weiß ummantelt  
 Zentrifuge Labofuge Function Line 400

Promega, Mannheim  
 Berthold Technologies, Bad Wildbad  
 PAA Laboratories, Cölbe  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 PAA Laboratories, Cölbe  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen  
 Falcon über BD Biosciences, Hamburg  
 Heraeus Instruments, Hanau

## 2.6 TUNEL-Assay

Aceton	Merck, Darmstadt
Deckgläschen	Menzel Gläser, Braunschweig
Feuchte Kammer	selbst hergestellt
<i>In Situ Cell Death Detection Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysepuffer:	selbst hergestellt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaulösung	Merck, Darmstadt
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Peroxidase Substrat Kit DAB	Vector Laboratories über Alexis, Grünwald
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 500 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipette	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
12-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

## 2.7 Transfektion

HiperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Kontroll-siRNA	Qiagen, Hilden
L1CAM-siRNA	Qiagen, Hilden
Optimem-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 500 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipette	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
12-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### **3. Methoden**

#### **3.1 Zellkultur**

Sowohl die PDAC- als auch die Ovarialkarzinomzelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % kultiviert.

Für die PDAC-Zelllinie PT45-P1res wurde als Kulturmedium RPMI 1640 mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin verwendet.

Die PDAC-Zelllinie Colo357 wurde ebenfalls in RPMI 1640 gehalten, welchem noch 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Natriumpyruvat zugesetzt wurden.

Als Kulturmedium für die Ovarialkarzinomzellen OV-MZ-6 und Skov3ip wurde DMEM high glucose Medium mit 10 % FCS und 1 % L-Glutamin versetzt.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Bei einer 80 %-igen Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen geteilt. Dafür wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1×Trypsin/EDTA für 5 bis 15 Minuten je nach Zelllinie abgelöst. Der Ablösevorgang wurde durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt, die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen mit je 10 ml Medium verteilt.

#### **3.2 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

##### **3.2.1 Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) ermöglicht das Zählen und die Charakterisierung aller in Suspension befindlichen Zellen aufgrund von Streulicht oder Fluoreszenz.

Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom den Laserstrahl, wodurch das Laserlicht auf Detektoren gestreut wird. Das Streulicht wird unterteilt in Vorwärtsstreulicht (FSC), welches mit der Zellgröße korreliert sowie in ein Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Granularität einer Zelle.

Zusätzlich können die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, die im Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden und somit Licht einer spezifischen Wellenlänge emittieren. Diese Methode eignet sich unter anderem zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Das emittierte Licht ist dabei proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zeit.

### **3.2.2 Färbung von L1CAM mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

Vor Beginn der Behandlungsversuche sollte sichergestellt werden, dass die unterschiedlichen Antikörper eine gute Bindungsfähigkeit an L1CAM auf den Tumorzelllinien aufweisen. Dazu wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt, bei der die Tumorzellen mit den spezifischen Antikörpern in einer Pufferlösung inkubiert wurden, um die Antikörper-Antigen-Bindung zu ermöglichen. Um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden, wurden nicht-gebundene Antikörper in der Pufferlösung vor Inkubation mit dem Zweitantikörper herausgewaschen. Der Zweitantikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des Erstantikörpers und ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert. Die abschließende Analyse erfolgte am Fluoreszenz-Durchflusszytometer.

#### **3.2.2.1 Durchführung**

Bei einer 80 %-igen Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA pro Kulturflasche abgelöst und in ein 50 ml Röhrchen umgefüllt. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation der Zellen bei 1200 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS gewaschen und erneut bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, erfolgte die Blockierung der Zellen mit 4 % BSA/PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Im Anschluss daran wurden die Zellen ein weiteres Mal zentrifugiert, die Blockierlösung abgesaugt, das Pellet in PBS resuspendiert und gleichmäßig auf die benötigte Anzahl an FACS-Röhrchen verteilt und bei 1200 Umdrehungen pro Minute wiederum 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Ansätze blieben entweder unbehandelt oder wurden mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Erstantikörper auf Eis inkubiert, wobei die Antikörper in 100 µl 4 % BSA/PBS verdünnt wurden. Nach 30 Minuten folgte ein Waschgang in PBS. Aufgrund der Konjugation



des Zweitantikörpers mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488, erfolgte die anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis. Dabei wurde der Antikörper in einem Verhältnis von 1:500 in 4 % BSA/PBS verdünnt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und abschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Die Messung der Proben wurde am Fluoreszenz-Durchflusszytometer unter Verwendung der Flomax-Software durchgeführt.

### **3.2.3 Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid**

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden die Zellen mit Annexin-V, konjugiert mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC), und Propidiumjodid angefärbt. Zellen in der Apoptose externalisieren Phosphatidylserin, welches in einer lebenden Zelle auf der Membranninnenseite lokalisiert ist. Annexin-V bindet an externalisiertes Phosphatidylserin und kennzeichnet auf diese Weise apoptotische Zellen. Propidiumjodid dagegen ist ein interkalierender Farbstoff, der nur über poröse Zellmembranen in das Zellinnere gelangt und somit als Marker für tote Zellen fungiert.

Frühapoptotische Zellen besitzen noch eine intakte Zellmembran und lassen sich daher nur mit Annexin-V anfärben, jedoch nicht mit Propidiumjodid. Spätapoptotische Zellen haben keine intakte Membran mehr und sind somit sowohl für Annexin-V als auch für Propidiumjodid positiv. Nekrotische Zellen lassen sich dagegen nur mit Propidiumjodid anfärben. Für die Ermittlung apoptotischer Zellen wurden sowohl früh- als auch spätapoptotische Zellen in die Auswertung mit einbezogen.

#### **3.2.3.1 Durchführung**

Die Ovarialkarzinomzelllinien wurden in 6-Well-Platten in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well in 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden blieben die OV-MZ-6 Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit 10 µg/ml Paclitaxel oder 1 µg/ml Cisplatin allein oder in Kombination mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml einer der Antikörper stimuliert. Die Behandlung der Skov3ip Zellen erfolgte analog zu den OV-MZ-6 Zellen mit einer Konzentration von 5 µg/ml Paclitaxel. Die Stimulation mit den Antikörpern erfolgte bei beiden Zelllinien 30 Minuten vor Zugabe des Zytostatikums. 24 Stunden nach

Zytostatikagabe wurden die Zellen für die Annexin-V-/Propidiumjodid-Färbung aufgearbeitet.

Dafür wurde das Medium aus den Wells in 15 ml Röhrchen überführt, die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Well abgelöst und in die entsprechenden Röhrchen zu dem Medium gegeben. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Medium verworfen und die Zellen in PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation der Zellen und Absaugen des Überstandes wurden in jedes Röhrchen 200 µl Annexin-V-Binding-Buffer, 5 µl Annexin-V und 5 µl Propidiumjodid gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 Minuten. Die durchflusszytometrische Messung unter Zuhilfenahme der Flomax-Software erfolgte mit jeder Probe in 1 ml Sheath-Puffer in FACS-Röhrchen.

### **3.3 Caspase-3/-7-Assay**

#### **3.3.1 Prinzip des Caspase-3/-7-Assays**

Als weiteres Testverfahren zur Bestimmung von Apoptoseinduktion wurde der Caspase-3/-7-Assay verwendet.

In der Regel kommt es im Rahmen des programmierten Zelltods zu einer gesteigerten Aktivität von Caspasen und damit auch zu einer erhöhten Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7. Im Caspase-3/-7-Assay wird nach Zugabe eines spezifischen Substrats dieses in Gegenwart von aktivierter Caspase-3/-7 gespalten, wobei Aminoluciferin als Substrat für die Luciferase in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt wird. Das dabei entstehende Licht wird im Luminometer gemessen und ist proportional zu der Caspase-3/-7-Aktivität.

#### **3.3.2 Durchführung**

Für den Caspase-3/-7-Assay wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 1 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden blieben die Zellen entweder unbehandelt, oder wurden im Fall der PDAC-Zelllinien mit 20 µg/ml Etoposid, 10 µg/ml Gemcitabin oder 5 µg/ml 5-Fluorouracil allein oder jeweils in Kombination mit den Antikörpern in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml stimuliert. Für die Behandlung der Ovarialkarzinomzelllinien wurden als Zytostatika 5 µg/ml Paclitaxel und 1 µg/ml Cisplatin eingesetzt. Bei allen Zelllinien erfolgte die Stimulation mit den Antikörpern 30 Minuten vor

Gabe des Zytostatikums und 24 Stunden danach die Aufarbeitung. Wurden die Zelllinien zuvor transfiziert, so erfolgte die Stimulation mit den Antikörpern bzw. den Zytostatika 48 Stunden nach Transfektion. Die Aufarbeitung der Zellen wurde 24 Stunden nach Zytostatikastimulation durchgeführt.

Das Medium wurde aus den Wells mit Hilfe einer Transferpipette in die 15 ml Röhrchen überführt, die Zellen mit je 0,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst und in die Röhrchen mit den korrespondierenden Überständen gegeben. Bei 1500 Umdrehungen pro Minute wurden die Zellen für 5 Minuten zentrifugiert und das Medium verworfen. Das Pellet wurde in PBS gewaschen, erneut für 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspension der Zellen in 500 µl PBS wurden für die Bestimmung der Caspase-3/-7-Aktivität je 25 µl Probe mit je 25 µl Caspasesubstratlösung in eine weiß ummantelte 96-Well-Platte im doppeltem Ansatz pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Caspase-3/-7-Aktivität im Luminometer. Um eine durch die Behandlung induzierte Zelltod-bedingte Abnahme der Zellzahl und damit einhergehend eine falsche Reduktion der Caspase-3/-7-Aktivität zu berücksichtigen, wurde parallel die Zellzahl jeder Probe bestimmt. Zur Bestimmung der Caspaseaktivität einer Probe wurde dann der Mittelwert der Caspase-3/-7-Aktivität auf die dazugehörige Zellzahl bezogen. Die Ergebnisse sind dargestellt als n-fache Caspase-3/-7-Aktivität induziert durch die jeweilige Behandlung gegenüber der unbehandelten Probe.

### **3.4 TUNEL-Assay**

#### **3.4.1 Prinzip des TUNEL-Assays**

TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) ist eine Methode zum Detektieren und Quantifizieren apoptotischer Zellen durch Anfärbung von DNA-Fragmenten. Bei der Apoptose entstehen durch die enzymatische Aktivität der Endonukleasen DNA-Strangbrüche. Die dabei freiwerdenden 3'OH-Termini können in einer enzymatischen Reaktion durch modifizierte Nukleotide in drei Schritten sichtbar gemacht werden.

Im ersten Schritt katalysiert die Terminale-deoxynukleotid-Transferase (TdT) die Polymerisierung der markierten Nukleotide an die freien 3'OH-Gruppen. Das dadurch gebundene Fluorescein wird im zweiten Schritt durch Inkubation mit einem anti-Fluorescein-Antikörper konjugiert an Peroxidase detektiert. Das Sichtbarwerden der apoptotischen Zellen

unter dem Lichtmikroskop wird im letzten Schritt durch Hinzufügen des Peroxidasesubstrats erreicht.

### 3.4.2 Durchführung

Die Detektion der fragmentierten DNA erfolgte in den PDAC-Zelllinien unter Verwendung des *In situ cell death detection kit* der Firma Roche Diagnostics.

Dazu wurden die PDAC-Zelllinien in 12-Well-Platten auf Deckgläschen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 1 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden (PT45-P1res) bzw. 48 Stunden (Colo357) blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit 20 µg/ml Etoposid, 10 µg/ml Gemcitabin oder 10 µg/ml 5-Fluorouracil allein oder mit 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml der jeweiligen Antikörper behandelt. Ähnlich wie für den Caspase-3/-7-Assay erfolgte die Stimulation mit den Antikörpern 30 Minuten vor und die Aufarbeitung 24 Stunden nach Zugabe des Zytostatikums.

Dafür wurde das Medium aus den Wells abgesaugt, so dass die Deckgläschen für 20 Minuten bei Raumtemperatur trocknen konnten. Bei -20°C in einem Gemisch aus Aceton und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 100:1 wurden die Zellen für zehn Minuten fixiert. Es folgten eine zehnminütige Trockenphase und drei Waschgänge in PBS für jeweils fünf Minuten. Zur Permeabilisierung der Kernmembran wurden die Deckgläschen für zwei Minuten in einem Träger in eine Küvette mit frisch angesetztem Lysepuffer (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % TritonX-100 in 50 ml destilliertem Wasser) auf Eis getaucht. Nach drei Waschgängen zu je 5 Minuten in PBS erfolgte die Inkubation mit je 7,5 µl Enzymlösung und 75 µl Nukleotidlösung pro Ansatz für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Vor und nach Inkubation mit 75 µl anti-Fluorescein-Antikörper-Peroxidase pro Deckgläschen für 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer erfolgten jeweils drei Waschgänge in PBS. Durch anschließende Zugabe von 75 µl DAB-Substratlösung pro Ansatz erfolgte die Braunfärbung der apoptotischen Zellen, wobei die Entwicklung bei deutlich brauner Farbe nach ca. zwei bis drei Minuten durch Leitungswasser abgestoppt wurde. Danach wurden die Deckgläschen für zehn Minuten in Leitungswasser gewässert, die Kerne in einer 50 %-igen Hämalun-Lösung für maximal 1 Minute angefärbt und die Proben anschließend in Leitungswasser gebläut. Um die Proben unter dem Mikroskop analysieren zu können, wurden sie mit Kaiser's Glycingelatine auf Objektträgern eingedeckelt.

### 3.5 Verminderung der L1CAM Expression mittels siRNA

#### 3.5.1 Prinzip der siRNA

Um die Effektivität der L1CAM Blockade mittels blockierender Antikörper mit der Hemmung von L1CAM durch Verminderung des Expressionslevels hinsichtlich ihrer chemosensitivierenden Wirkung zu vergleichen, wurde die L1CAM-Expression mittels Transfektion von spezifischer siRNA unterbunden.

Small interfering RNA (siRNA) ist ein Doppelstrang-RNA Molekül mit einer Länge von ca. 20 bis 25 Basenpaaren. Nach Einbringen der siRNA in die Zelle bindet diese an die komplementäre mRNA-Sequenz, führt zu deren Abbau und hemmt dadurch die Genexpression. Im Vergleich zu anderen manipulierenden Methoden liegt der Vorteil der spezifischen siRNA in ihrer extrem hohen inhibitorischen Aktivität und der sehr spezifischen Hemmung. Der *knockdown* mittels siRNA gilt als Mittel der Wahl um den Funktionsverlust individueller Gene zu untersuchen.

#### 3.5.2 Durchführung

Die Tumorzellen wurden in 12-Well-Platten in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 1 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion. Dazu wurde pro Well ein Ansatz aus 100 µl Optimem-Medium, 6 µl HiperFect Transfektionsreagenz und 0,4 µl siRNA hergestellt. Für jede Zelllinie wurde jeweils ein Ansatz mit L1CAM-siRNA und einer mit einer Kontroll-siRNA hergestellt und jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Transfektion wurde das Medium in den Wells gewechselt und die jeweiligen Transfektionsansätze dann tröpfchenweise in die Wells dazugegeben. 48 Stunden später erfolgte entweder die Aufarbeitung für die L1CAM-Färbung (unter Punkt 3.2.2.1 beschrieben) oder die Stimulation für den Caspase-3/-7-Assay mit nachfolgender Aufarbeitung (siehe Punkt 3.3.2).

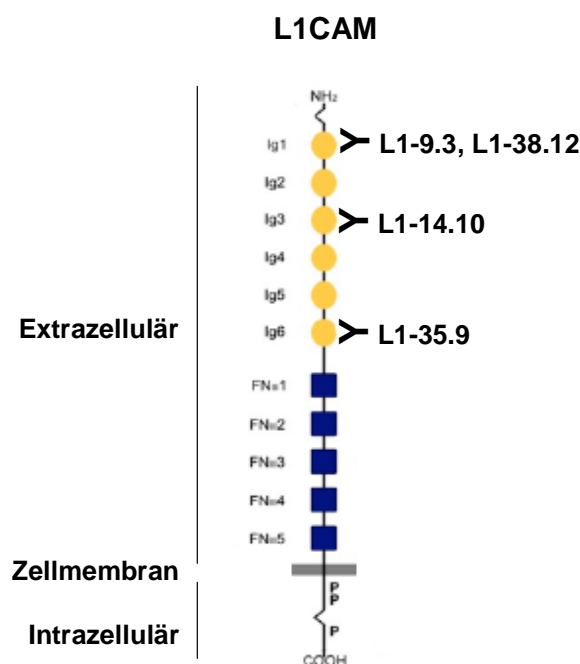
### 3.6 Statistik

Die Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und der Signifikanzen erfolgte mit Microsoft Excel 2003. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der Student'sche t-Test

(gepaarter Test mit einseitiger Verteilung) verwendet, wobei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet wurde.

## 4. Ergebnisse

In Abbildung 1 ist das Zelladhäsionsmolekül L1CAM bestehend aus einer Extrazellulärregion, einer Transmembransequenz und einer zytoplasmatischen Domäne dargestellt. Alle zu testenden Antikörper binden an den extrazellulären Anteil des Moleküls, wobei die Antikörper L1-9.3 und L1-38.12 an die erste Ig-Domäne, der L1-14.10 an die dritte und L1-35.9 an die sechste Ig-Domäne bindet. Alle Antikörper weisen einen Maus-IgG1 Isotyp auf.



**Abbildung 1:** Schematische Struktur des L1CAM-Moleküls mit den Bindungsstellen der zu testenden Antikörper L1-9.3, L1-38.12, L1-14.10 und L1-35.9. Dargestellt ist der extrazelluläre Teil mit sechs Ig-Domänen und den sich anschließenden fünf FN-III-ähnlichen Domänen. Nach einem kurzen transmembranen Bereich folgt der konservierte intrazelluläre zytoplasmatische Bereich.

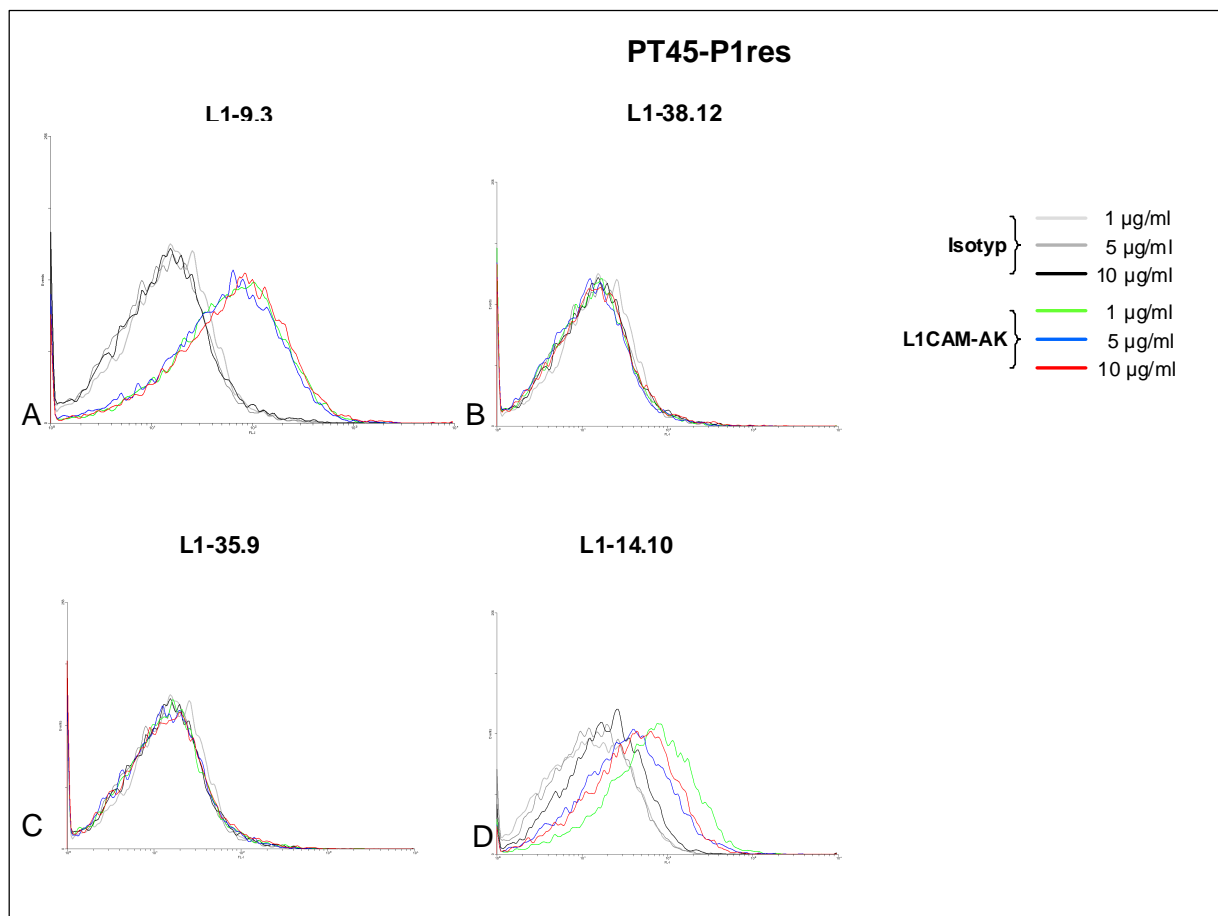
### 4.1 Überprüfung der L1CAM-spezifischen Antikörper zur Detektion von L1CAM auf Tumorzelllinien

Um zu überprüfen, ob die L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3, L1-38.12, L1-14.10 und L1-35.9 zur Detektion von membranständigem L1CAM auf Tumorzellen geeignet sind, wurde eine L1CAM-Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Dazu wurden die PDAC- und Ovarialkarzinomzelllinien jeweils mit den vier zu

testenden L1CAM Antikörpern bzw. einem Maus IgG1-Antikörper als Isotypenkontrolle gefärbt. Die Antikörper wurden dabei in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt, wie sie in den nachfolgenden Sensitivierungsversuchen verwendet wurden.

#### 4.1.1 PT45-P1res Zellen

Wie in dem repräsentativ ausgewählten Histogramm (Abb. 2A) zu erkennen ist, wiesen die mit L1-9.3 gefärbten PT45-P1res Zellen in allen drei Konzentrationen einen deutlich höheren Anteil Fluoreszenz-markierter Zellen auf als die entsprechenden Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu war der Anteil Fluoreszenz-markierter Zellen in den mit L1-38.12 (Abb. 2B) und L1-35.9 (Abb. 2C) gefärbten Proben in allen drei Konzentrationen nicht erhöht. Die mit L1-14.10 gefärbten PDAC-Zellen (Abb. 2D) zeigten hingegen in allen drei Konzentrationen einen sichtbaren Anstieg Fluoreszenz-markierter Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit der Isotypenkontrolle gefärbt wurden.



**Abbildung 2:** L1CAM-Färbung von PT45-P1res Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml mIgG1 (Isotyp) sowie (A) L1-9.3, (B) L1-38.12, (C) L1-35.9, (D) L1-14.10 gefärbt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

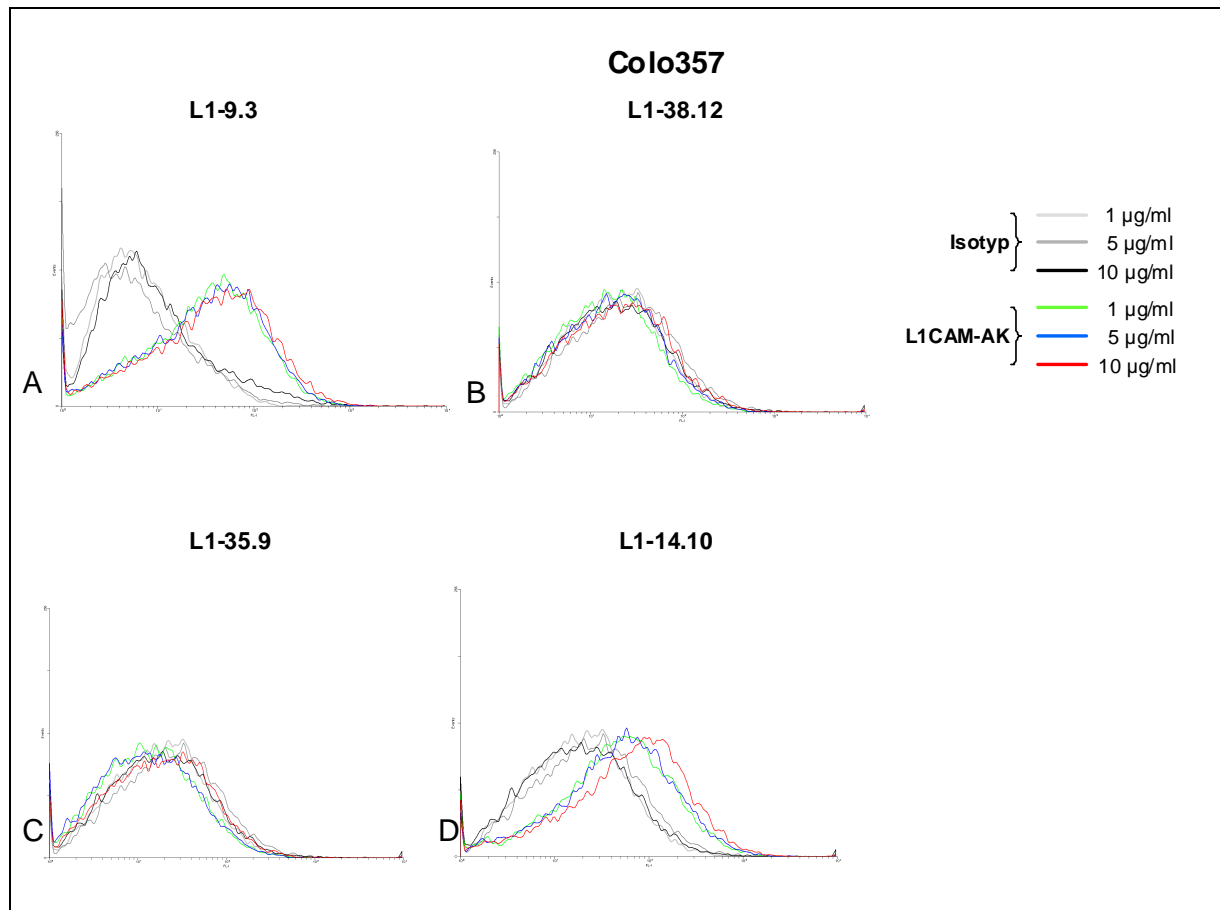


Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den L1CAM-spezifischen Antikörpern L1-9.3 und L1-14.10 in allen drei Konzentrationen eine 4 bis 5-fach bzw. eine 1,5 bis 2-fach erhöhte L1CAM-Markierung als mit den entsprechenden IgG1-Isotypenkontrollen erzielt werden konnte. Die Antikörper L1-38.12 und L1.35.9 zeigten hingegen gegenüber den Kontrollproben keine erhöhte L1CAM-Bindung.

#### **4.1.2 Colo357 Zellen**

Um die Bindungsfähigkeit der L1CAM-spezifischen Antikörper an einer weiteren PDAC-Zelllinie zu überprüfen, wurde die PDAC-Zelllinie Colo357 einer L1CAM-Färbung unterzogen. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wurden mit den Colo357 Zellen ähnliche Ergebnisse wie mit den PT45-P1res Zellen erzielt. Abbildung 3A zeigt dabei deutlich, dass auch bei dieser Zelllinie die mit L1-9.3 gefärbten Zellen im Vergleich zu den Kontrollproben in allen drei Konzentrationen einen stark erhöhten Anteil Fluoreszenz-markierter Zellen aufwiesen. Die mit den spezifischen Antikörpern L1-38.12 (Abb. 3B) und L1-35.9 (Abb. 3C) behandelten Proben zeigten dagegen im Vergleich zu der IgG1-Isotypenkontrolle in den drei verwendeten Konzentrationen keine sichtbare Zunahme Fluoreszenz-markierter Zellen. Durch Verwendung des L1-14.10 Antikörpers konnte hingegen eine deutliche Anfärbbarkeit der Colo357 Zellen erzielt werden (Abb. 3D).

Wie schon bei der L1CAM-spezifischen Färbung der PT45-P1res Zellen erkennbar war, zeigte auch die Färbung der Colo357-Zelllinie deutlich, dass die L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 in allen drei Konzentrationen eine im Vergleich zu der Isotypenkontrolle deutlich erhöhte L1CAM-Bindung aufwiesen, wohingegen mit den L1CAM-Antikörpern L1-38.12 und L1-35.9 keine Detektion von L1CAM zu erzielen war.



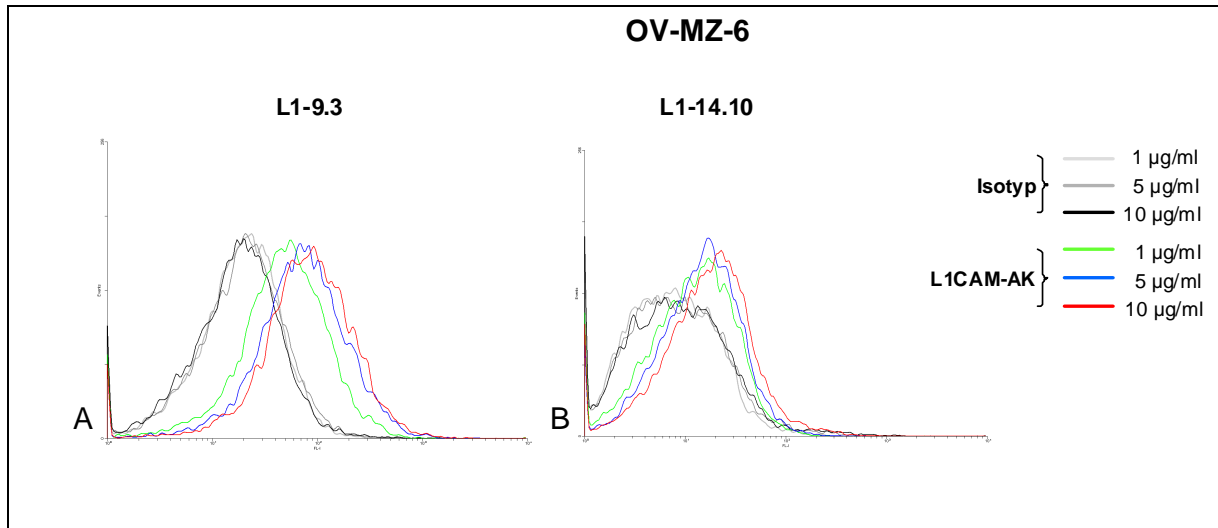
**Abbildung 3:** L1CAM-Färbung von Colo357 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml mIgG1 (Isotyp) sowie (A) L1-9.3, (B) L1-38.12, (C) L1-35.9, (D) L1-14.10 gefärbt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Aus den gezeigten Versuchen kann geschlossen werden, dass die L1CAM-Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 in den getesteten Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml bei beiden PDAC-Zelllinien eine deutliche Bindungsaffinität zu L1CAM aufweisen.

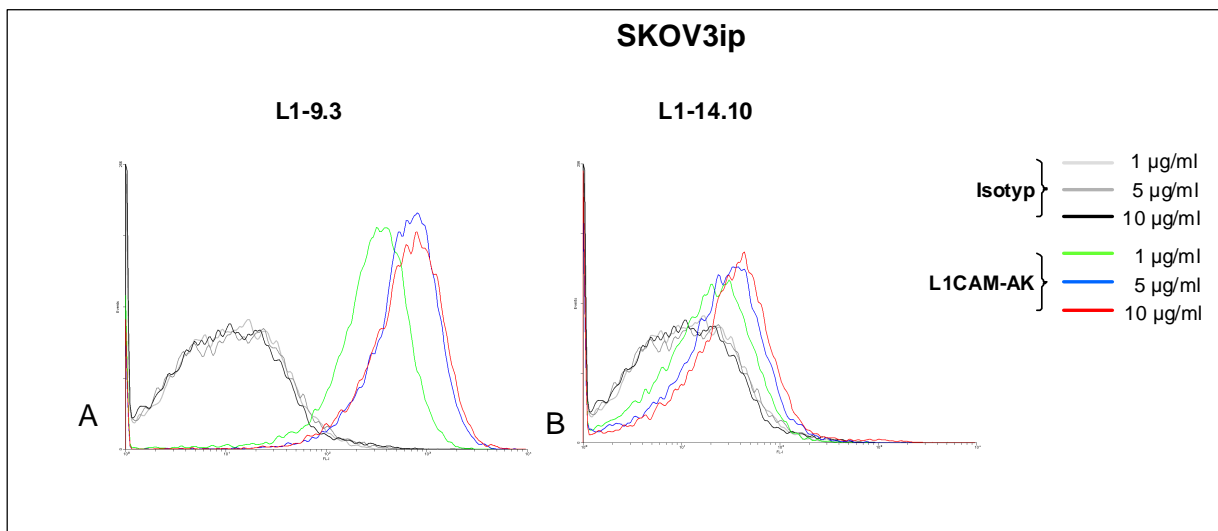
#### 4.1.3 OV-MZ-6 und Skov3ip

Da bei beiden PDAC-Zelllinien nur die Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 eine deutliche Bindungsaffinität gegenüber membranständigem L1CAM zeigten, wurden nur noch diese beiden Antikörper mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie auf ihre Bindungsfähigkeit bei den Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und Skov3ip getestet. Wie in den repräsentativ ausgewählten Histogrammen in den Abbildungen 4 und 5 zu sehen ist, wiesen sowohl die mit L1-9.3 (Abb. 4A und Abb. 5A) als auch die mit L1-14.10 (Abb. 4B und Abb. 5B) angefärbten Zellen in allen drei Konzentrationen einen deutlich höheren Anteil Fluoreszenz-markierter

Zellen auf als die Kontrollproben, die mit den entsprechenden Konzentrationen an mIgG1 gefärbt wurden. Ähnlich wie bei den PDAC-Zelllinien wurde mit dem L1-9.3 Antikörper eine stärkere Anfärbbarkeit beider Ovarialkarzinomzelllinien erzielt als mit dem L1-14.10 Antikörper.



**Abbildung 4:** L1CAM-Färbung von OV-MZ-6 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml mIgG1 (Isotyp) sowie (A) L1-9.3, (B) L1-14.10 gefärbt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt



**Abbildung 5:** L1CAM-Färbung von Skov3ip Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml mIgG1 (Isotyp) sowie (A) L1-9.3, (B) L1-14.10 gefärbt. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt

Da im Rahmen dieser Versuche gezeigt werden konnte, dass nur die Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 eine hohe Affinität zu membranständigem L1CAM auf allen vier Tumorzelllinien

aufwiesen, wurden diese beiden Antikörper in den nachfolgenden Sensitivierungsversuchen eingesetzt.

## **4.2 Bestimmung der Zytostatika-induzierten Apoptose in PDAC- und Ovarialkarzinomzelllinien unter Antikörper-vermittelter L1CAM-Blockade**

### **4.2.1 Bestimmung der Behandlungs-induzierten Apoptose mittels Caspase-3/-7-Assay**

Kennzeichnend für das PDAC und das Ovarialkarzinom ist eine ausgeprägte Chemoresistenz, die unter anderem durch das Adhäsionsmolekül L1CAM vermittelt wird [Sebens Muerkoster et al. 2007; Stoeck et al. 2007; Geismann et al. 2009]. In dieser Arbeit sollte daher das chemosensitivierende Potential verschiedener L1CAM-blockierender Antikörper an den PDAC-Zelllinien PT45-P1res und Colo357 sowie an den Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und Skov3ip untersucht werden. Im Vergleich zu anderen PDAC- und Ovarialkarzinomzelllinien zeichnen sich diese durch ein schlechteres Ansprechen auf Zytostatika aus [Arlt et al. 2001; Arlt et al. 2002; Arlt et al. 2003; Stoeck et al. 2007].

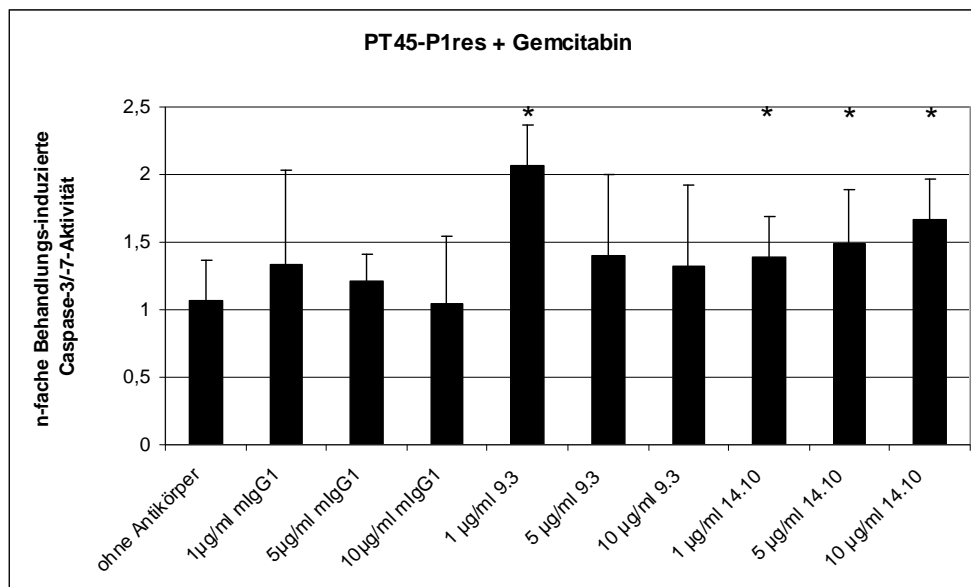
Als Maß für die Chemosensitivierung diene die Apoptoserate der Tumorzellen nach Behandlung mit den Antikörpern in Kombination mit einem Zytostatikum im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Zytostatikum allein behandelt wurden. Als Standardmethode wurde dazu ein Caspase-3/-7-Assay 24 Stunden nach Behandlung durchgeführt, mit dem die Caspase-3/-7-Aktivität mittels Lumineszenzmessung bestimmt wurde. Um stark variierende Zellzahlen durch die unterschiedlichen Behandlungen zu berücksichtigen, erfolgte parallel eine Zellzahlbestimmung, so dass die Ergebnisse als n-fache Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität (n-fach von unbehandelt) bezogen die auf jeweilige Zellzahl dargestellt sind.

#### **4.2.1.1 PT45-P1res Zellen**

Zur Zytostatikabehandlung der beiden PDAC-Zelllinien PT45-P1res und Colo357 wurden die standardmäßig zur Behandlung des PDAC eingesetzten Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluorouracil verwendet. Darüber hinaus wurde Etoposid verwendet, das zwar nicht für die Behandlung des PDAC zugelassen ist, womit aber in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe

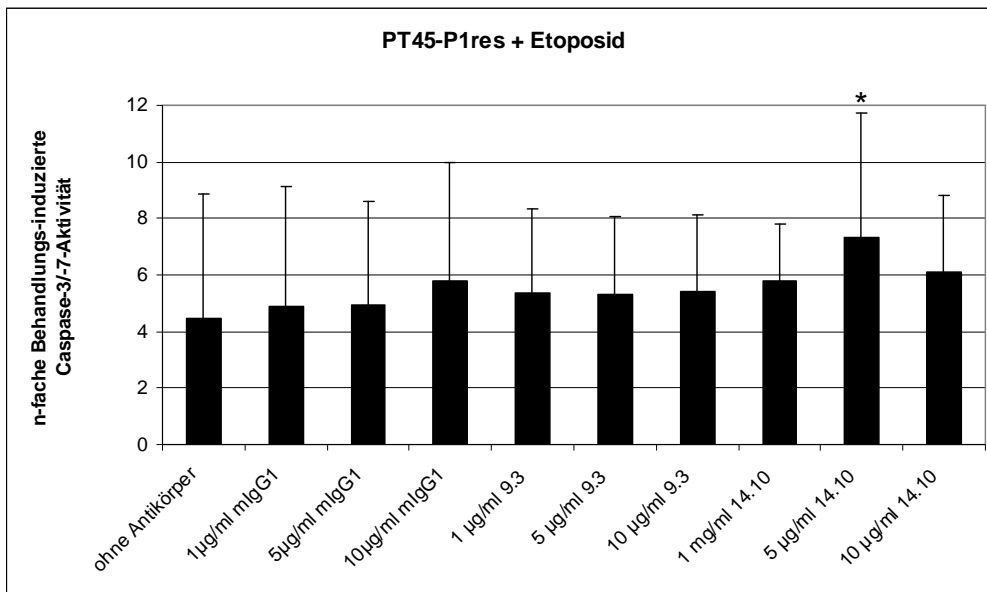
sehr gute Chemosensitivierungseffekte in verschiedenen PDAC-Zelllinien nach Blockade von NF- $\kappa$ B oder IL-1 $\beta$  erzielt wurden [Arlt et al. 2001; Arlt et al. 2002; Mürköster et al. 2003].

Im Vergleich zu Zellen, die nur mit 10  $\mu$ g/ml Gemcitabin behandelt wurden, führte die kombinierte Behandlung der PT45-P1res Zellen mit den Antikörpern L1-9.3 und L1-14.10 in allen drei Konzentrationen zu einer Zunahme der Caspase-3/-7-Aktivität (Abb. 6). Die Kombination mit der Isotypenkontrolle führte zwar auch zu einer leichten Steigerung der Caspase-3/-7-Aktivität (maximal um 24 % in der Konzentration von 1  $\mu$ g/ml), die Kombination aus Gemcitabin mit 1  $\mu$ g/ml L1-9.3 vermochte die Caspase-3/-7-Aktivität jedoch signifikant um 93 % von 1,07-fach auf 2,07-fach zu erhöhen. Mit dem Antikörper L1-14.10 wurde der stärkste Sensitivierungseffekt in der Konzentration 10  $\mu$ g/ml erzielt (eine Erhöhung um 56 % von 1,07-fach auf 1,67-fach der Caspase-3/-7-Aktivität).



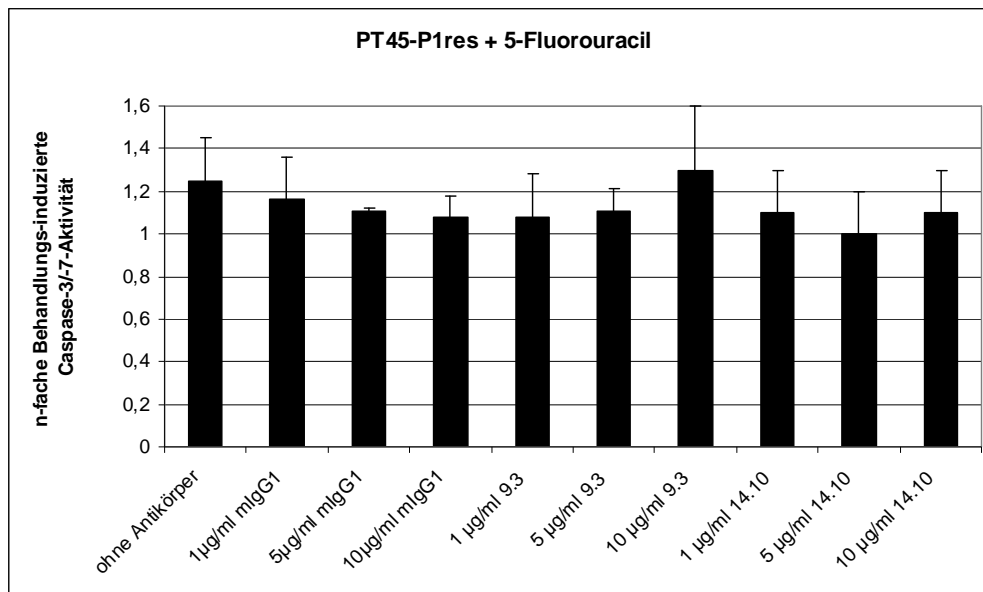
**Abbildung 6:** Caspase-3/-7-Aktivität in PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml oder 10  $\mu$ g/ml mlgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Ergebnisse sind präsentiert als n-fache durch die jeweilige Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0.05$ .

Die Kombinationsbehandlung aus dem Zytostatikum Etoposid und L1CAM-spezifischen Antikörpern führte zu einer Steigerung des apoptotischen Ansprechens um 21 % mit 10  $\mu$ g/ml L1-9.3 und um 63 % mit 5  $\mu$ g/ml L1-14.10 im Vergleich zur Behandlung mit Etoposid allein (ohne Antikörper), wobei letztere Erhöhung statistisch signifikant war (Abb. 7). Die Isotypenkontrolle zeigte nur in der höchsten Konzentration einen sensitivierenden Effekt und führte zu einer Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität von 4,48-fach auf 5,77-fach.



**Abbildung 7:** Caspase-3/-7-Aktivität in PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit Etoposid allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Daten sind präsentiert als n-fache durch die Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0.05$ .

Die Behandlung mit einem der beiden L1CAM-spezifischen Antikörper hatte hingegen keinen Effekt auf das apoptotische Ansprechen der PT45-P1res Zellen gegenüber dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (Abb. 8). So wiesen Zellen, die nur mit 5-Fluorouracil behandelt wurden, eine 1,25-fache Caspase-3/-7-Aktivität 24 Stunden nach Behandlung auf und Zellen, die zusätzlich mit dem L1-9.3 Antikörper behandelt wurden, eine Aktivität zwischen 1,1-fach (1 und 5 µg/ml) und 1,3-fach (10 µg/ml) und L1-14.10 behandelte Zellen ebenfalls eine 1,1-fache Caspase-3/-7-Aktivität (Abb. 8).



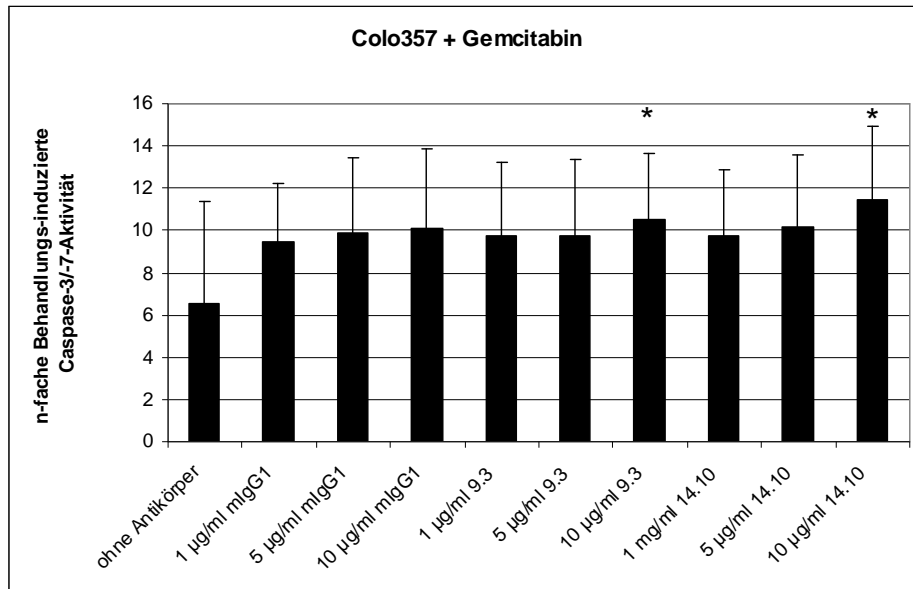
**Abbildung 8:** Caspase-3/-7-Aktivität in PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit 5-Fluorouracil allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Daten sind präsentiert als n-fache durch die Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zusätzliche Behandlung mit einem L1CAM-spezifischen Antikörper den stärksten chemosensitivierenden Effekt auf das apoptotische Ansprechen gegenüber Gemcitabin hat, wohingegen die Antikörper das Ansprechen auf 5-Fluorouracil nicht zu verbessern vermochte.

#### 4.2.1.2 Colo357 Zellen

Durch die Gabe der L1CAM-spezifischen Antikörper konnte bei der zweiten PDAC-Zelllinie Colo357 wie bei den PT45-P1res Zellen ein erhöhtes Ansprechen der Zellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung beobachtet werden.

So führten beide Antikörper in Kombination mit Gemcitabin zu einer Steigerung der Caspase-3/-7-Aktivität im Vergleich zur Behandlung mit Gemcitabin allein (Abb. 9).

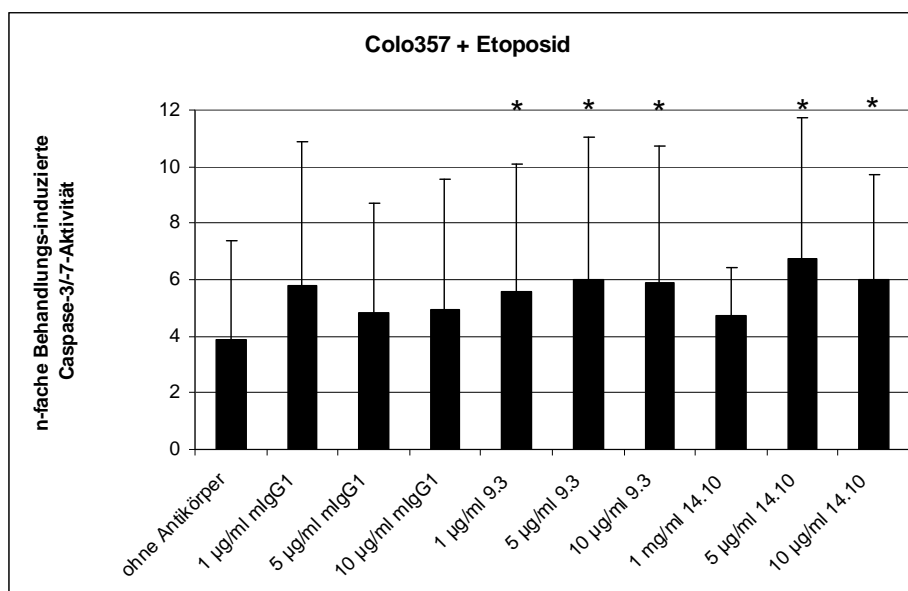


**Abbildung 9:** Caspase-3/-7-Aktivität in Colo357 Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Ergebnisse sind präsentiert als n-fache durch die jeweilige Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0.05$ .

Der stärkste chemosensitivierende Effekt wurde unter Verwendung des L1-9.3 Antikörpers in der Konzentration von 10 µg/ml beobachtet (Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität von 6,55-fach auf 10,56-fach). Die Kombination mit 10 µg/ml L1-14.10 führte sogar zu einer 11,5-fachen Caspase-3/-7-Aktivität und damit einer signifikanten Erhöhung um 75 %. Anzumerken ist jedoch, dass die zusätzliche Gabe der Kontrollimmunglobuline auch zu einer Erhöhung des apoptotischen Ansprechens auf Gemcitabin führte. Der stärkste chemosensitivierende Effekt war nach der Behandlung mit 10 µg/ml mIgG1 zu beobachten, was in einer 10-fachen Caspase-3/-7-Aktivität gegenüber unbehandelten Kontrollzellen resultierte.

Wie bei den PT45-P1res Zellen konnte durch die zusätzliche Behandlung mit dem Antikörper L1-9.3 ein verstärktes apoptotisches Ansprechen auf das Zytostatikum Etoposid erzielt werden (Abb. 10). Der stärkste Effekt war mit diesem Antikörper in der Konzentration von 5 µg/ml zu beobachten, mit der eine signifikante Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität um 55 % auf 6,02-fach im Vergleich zur 3,88-fachen Caspase-3/-7-Aktivität in Zellen, die nur mit Etoposid behandelt wurden. Die entsprechende Konzentration der Isotypenkontrolle führte hingegen nur zu einer Erhöhung um 27 %.

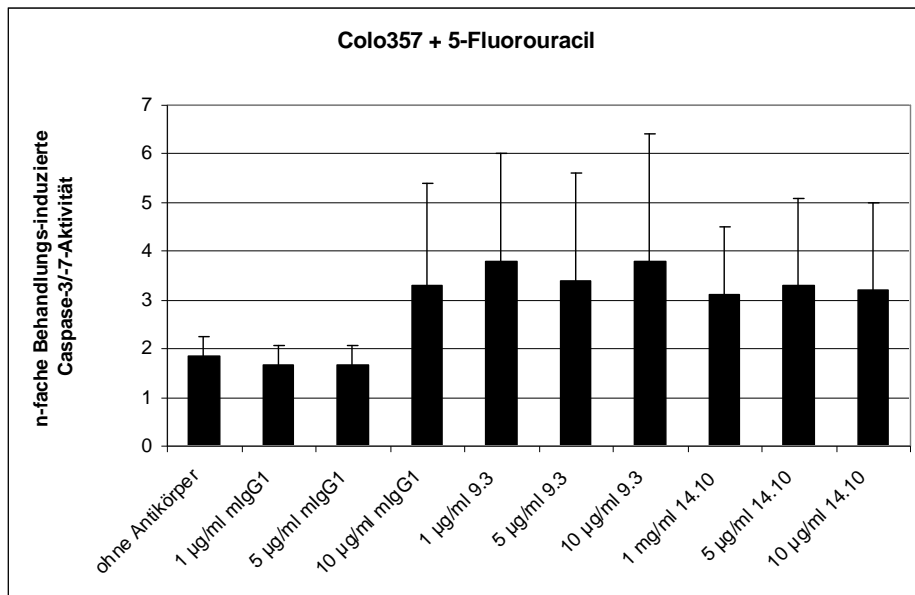




**Abbildung 10:** Caspase-3/-7-Aktivität in Colo357 Zellen nach Behandlung mit Etoposid allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Ergebnisse sind präsentiert als n-fache durch die jeweilige Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0.05$ .

Besonders ausgeprägt waren die Effekte, die nach Kombinationsbehandlung aus L1-14.10 und Etoposid beobachtet werden konnten. So resultierte die zusätzliche Behandlung mit 5 µg/ml L1-14.10 in einer 6,7-fachen Caspase-3/-7-Aktivität, was einer signifikanten Erhöhung um 73,5 % entspricht.

In der Kombination mit 5-Fluorouracil zeigten beide L1CAM-spezifischen Antikörper eine chemosensitivierende Wirkung, so dass Caspase-3/-7-Aktivitäten in den Colo357 Zellen zwischen 3,1-fach (bei 1 µg/ml L1-14.10) und 3,8-fach (bei 1 µg/ml L1-9.3) gegenüber einer 1,85-fachen Caspase-3/-7-Aktivität in Zellen detektiert wurden, die mit dem Zytostatikum allein behandelt wurden. Diese Effekte waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die IgG1-Isotypenkontrolle erhöhte das apoptotische Ansprechen nur in der höchsten Konzentration von 10 µg/ml.



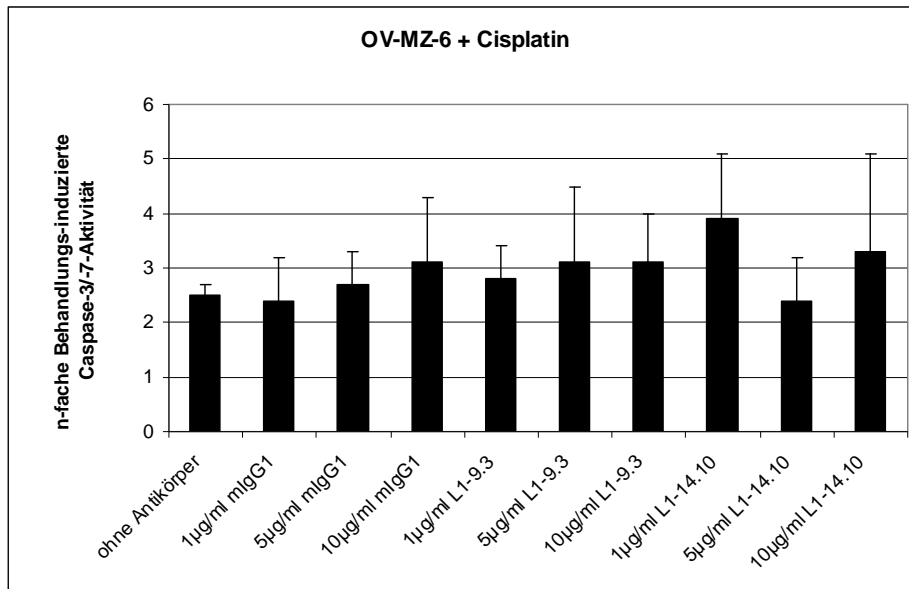
**Abbildung 11:** Caspase-3/-7-Aktivität in Colo357 Zellen nach Behandlung mit 5-Fluorouracil allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Ergebnisse sind präsentiert als n-fache durch die jeweilige Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass durch zusätzliche Behandlung mit den L1CAM-spezifischen Antikörpern L1-9.3 oder L1-14.10 das apoptotische Ansprechen gegenüber Zytostatika in PDAC-Zellen erhöht werden kann. Die konsistentesten Effekte ließen sich dabei durch Kombination einer der beiden Antikörper mit Gemcitabin erzielen.

#### 4.2.1.3 OV-MZ-6 Zellen

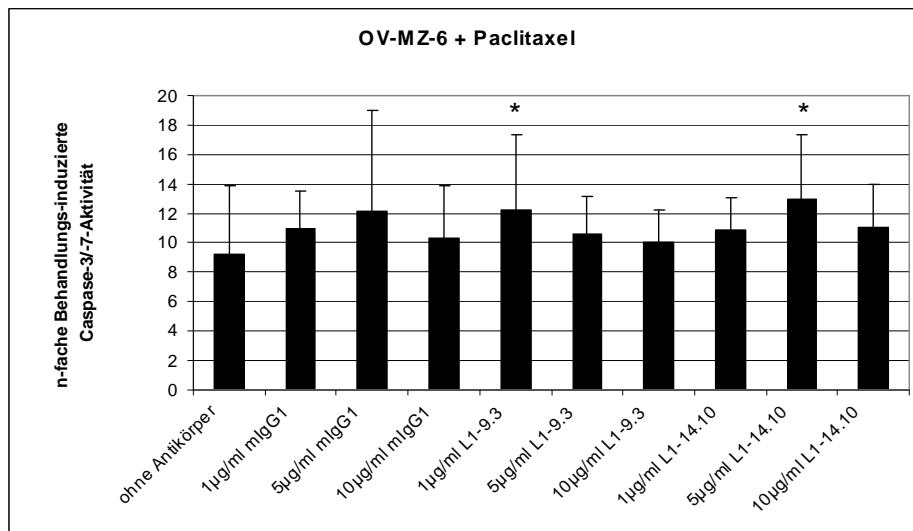
Um den chemosensitivierenden Effekt der beiden L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 auf Ovarialkarzinomzellen zu überprüfen, wurden OV-MZ-6 und Skov3ip Zellen entweder mit den Zytostatika Cisplatin oder Paclitaxel behandelt, welche beide zur Behandlung von Patientinnen mit dieser Tumorerkrankung in der Klinik eingesetzt werden.

In Kombination mit Cisplatin (Abb. 12) führte dabei die zusätzliche Behandlung mit 10 µg/ml L1-9.3 zu einer Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität von 2,5-fach auf 3,1-fach, ein Effekt der jedoch auch nach Gabe der Kontrollimmunglobuline in der entsprechenden Konzentration beobachtet werden konnte (Abb. 12). Der stärkste Effekt war nach Behandlung mit Cisplatin und 1 µg/ml L1-14.10 zu beobachten, wodurch die Caspase-3/-7-Aktivität um 56 % auf 3,9-fach erhöht werden konnte, was jedoch nicht statistisch signifikant war.



**Abbildung 12:** Caspase-3/-7-Aktivität in OV-MZ-6 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Ergebnisse sind präsentiert als n-fache durch die jeweilige Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

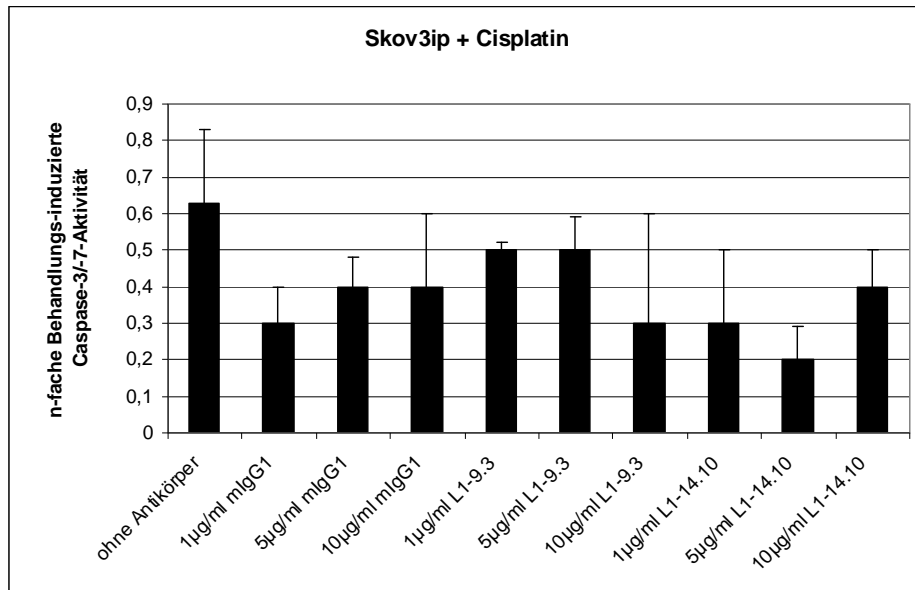
Wurden OV-MZ-6 Zellen mit Paclitaxel zusammen mit L1CAM-spezifischen Antikörpern behandelt, so konnte nach Gabe von 1 µg/ml L1.9.3 eine signifikante Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität um 33 % auf 12,23-fach erzielt werden (Abb. 13). Die Isotypenkontrolle erhöhte in dieser Konzentration zwar auch leicht das apoptotische Ansprechen, jedoch nur um 18 %. Der Antikörper L1-14.10 zeigte in der Konzentration 5 µg/ml den stärksten Effekt, und zwar wurde die Caspase-3/-7-Aktivität signifikant auf 13-fach erhöht gegenüber 9,2-fach in Zellen, die nur mit Paclitaxel behandelt wurden (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Caspase-3/-7-Aktivität in OV-MZ-6 Zellen nach Behandlung mit Paclitaxel allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Ergebnisse sind präsentiert als n-fache durch die Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0.05$ .

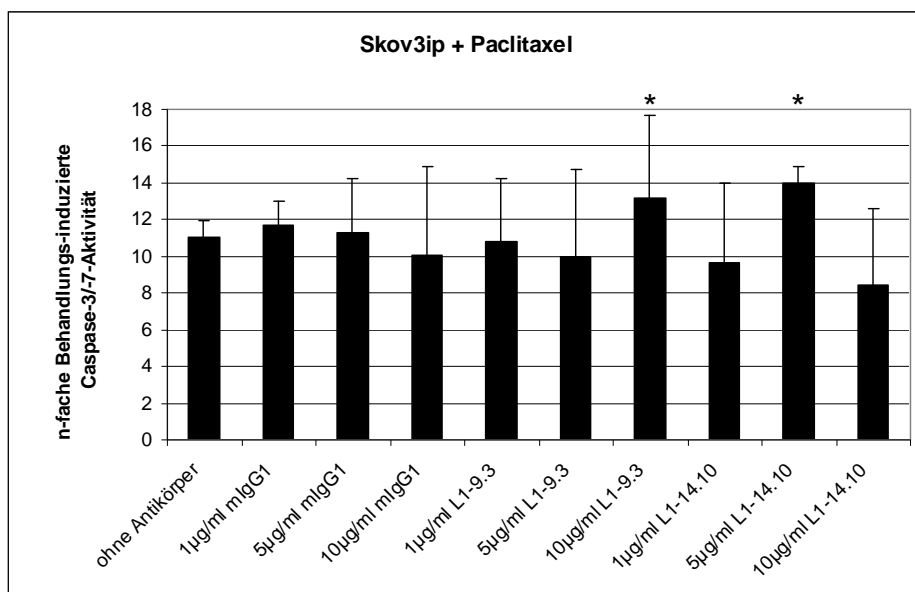
#### 4.2.1.4 Skov3ip Zellen

Als weitere Ovarialkarzinomzelllinie zur Überprüfung des chemosensitivierenden Potentials der L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 wurden Skov3ip Zellen untersucht. Die zusätzliche Gabe einer der beiden Antikörper führte zu keiner Erhöhung der Cisplatin induzierten Caspase-3/-7-Aktivität, sondern es konnte sogar eher eine Verminderung von 0,6-fach auf minimal 0,2-fach (5 µg/ml L1-14.10) beobachtet werden (Abb. 14). Dieser Effekt war auch nach Gabe der Kontrollantikörper in allen drei Konzentrationen zu verzeichnen.



**Abbildung 14:** Caspase-3/-7-Aktivität in Skov3ip Zellen nach Behandlung mit Cisplatin allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Daten sind präsentiert als n-fache durch die jeweilige Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen.

Während die L1CAM-spezifischen Antikörper keinen chemosensitivierenden Effekt in Kombination mit Cisplatin aufwiesen, konnte jedoch eine Erhöhung des apoptotischen Ansprechens auf Paclitaxel erzielt werden (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Caspase-3/-7-Aktivität in Skov3ip Zellen nach Behandlung mit Paclitaxel allein (ohne Antikörper) oder in Kombination mit 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Die Daten sind präsentiert als n-fache durch die Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten. \* =  $p < 0.05$ .

So wiesen Skov3ip Zellen nach Behandlung mit 10 µg/ml L1-9.3 und Paclitaxel eine 13,2-fache Caspase-3/-7-Aktivität auf im Vergleich zu einer 11-fachen in Zellen, die nur mit Paclitaxel behandelt wurden. Der stärkste Effekt war nach Behandlung mit 5 µg/ml L1-14.10 zu beobachten. Hier führte die zusätzliche Gabe des Antikörpers zu einer 14-fachen Caspase-3/-7-Aktivität. Die Kontrollantikörper erhöhten das apoptotische Ansprechen hingegen nur unwesentlich (5 % bei 1 µg/ml mIgG1) bzw. verminderten sogar leicht die Caspase-3/-7-Aktivität (10 µg/ml mIgG1).

Die Ergebnisse der Ovarialkarzinomzelllinien weisen daraufhin, dass auch bei dieser Tumorentität die zusätzliche Gabe von L1CAM-spezifischen Antikörpern in einer Chemosensitivierung und damit einem erhöhten apoptotischen Ansprechen der Tumorzellen resultiert, wobei dieser Effekt nicht durch Behandlung von Cisplatin, sondern nur mit Paclitaxel zu erzielen ist.

#### **4.2.2 Bestimmung der Behandlungs-induzierten Apoptose mittels TUNEL-Assay**

Als nächstes wurde untersucht, ob sich das chemosensitivierende Potential der L1CAM-spezifischen Antikörper mit einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigen lässt. Als zweites Verfahren wurden dafür die PDAC-Zelllinien PT45-P1res und Colo357 24 Stunden nach Behandlung mit einem Zytostatikum allein oder in Kombination mit den Antikörpern einem TUNEL-Assay unterzogen. Anschließend wurden die Proben lichtmikroskopisch ausgewertet, wobei die braun gefärbten Zellen in jeweils 10 Gesichtsfeldern pro Probe ausgezählt wurden.

##### **4.2.2.1 PT45-P1res Zellen**

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der TUNEL-Färbung mit den PT45-P1res Zellen. In Kombination mit Gemcitabin zeigte der Antikörper L1-14.10 die stärkste chemosensitivierende Wirkung. In der Konzentration von 5 µg/ml wurde in dieser Kombination eine 2,6-fache Steigerung der Apoptoseinduktion im Vergleich zu Zellen, die nur mit Gemcitabin allein behandelt wurden, beobachtet. Die Kombination mit 1 µg/ml oder 10 µg/ml L1-9.3 führte zu einer 1,4-fachen Erhöhung der apoptotischen Zellen. Die Kontrollantikörper beeinflussten die Apoptoseinduktion durch Gemcitabin hingegen nicht.

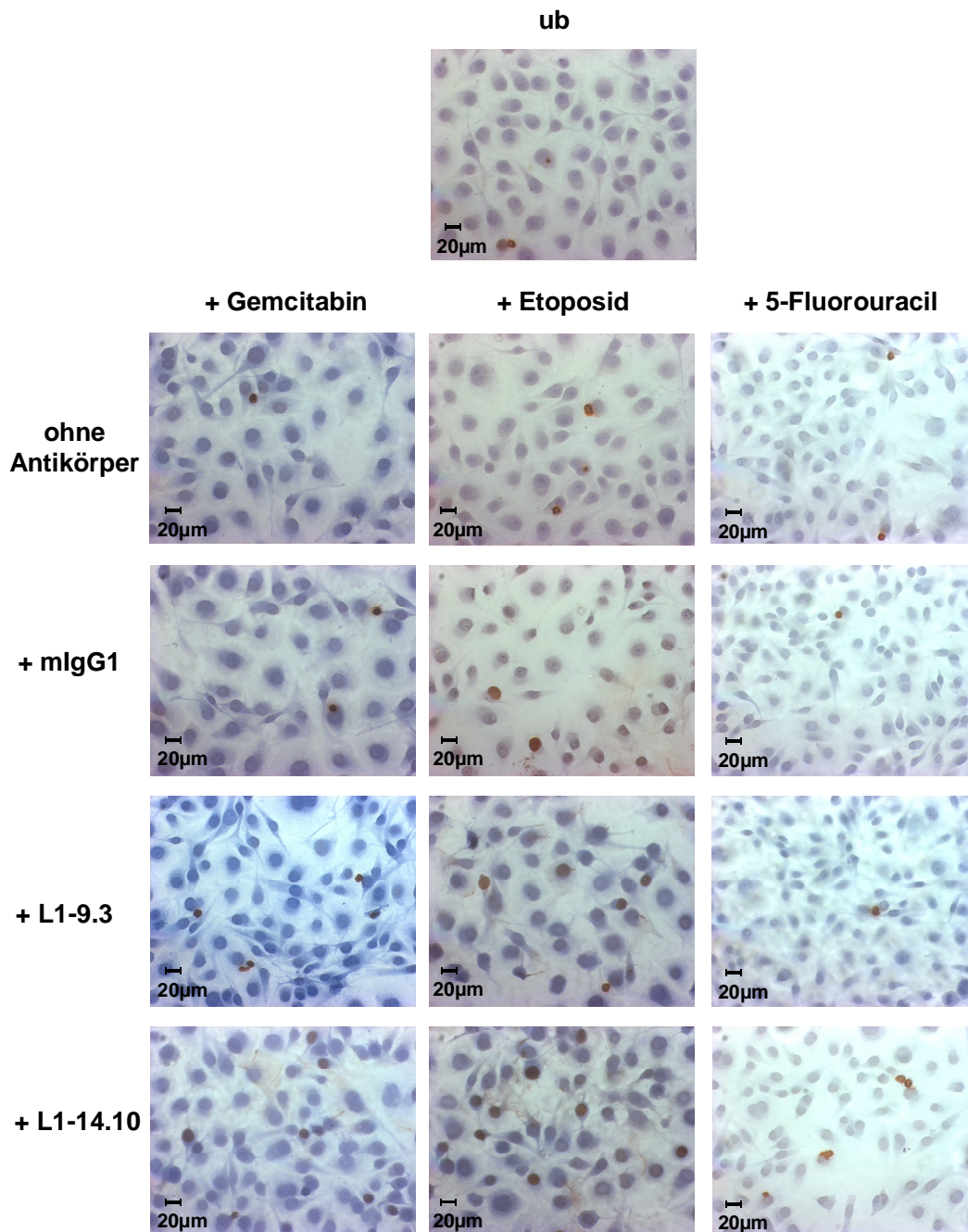
In Kombination mit Etoposid führten beide eingesetzten Antikörper zu einer deutlichen Zunahme apoptotischer Zellen. Die stärksten Effekte waren nach Gabe von 1 µg/ml L1-9.3 und 10 µg/ml L1-14.10 zu beobachten, wodurch jeweils eine 11-fache Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen erzielt werden konnte.

Wie bereits die Ergebnisse des Caspase-3/-7-Assays zeigten, führte die zusätzliche Gabe von L1-9.3 oder L1-14.10 zu keiner Steigerung der apoptotischen PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit 5-Fluorouracil.

**Tabelle 1:** TUNEL-Färbung von PT45-P1res Zellen. Anzahl apoptotischer PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin, Etoposid oder 5-Fluorouracil (5-FU) allein oder jeweils in Kombination mit einem Kontrollantikörper (mIgG1) oder einem L1CAM-spezifischen Antikörper. Ergebnisse von einem repräsentativen Versuch sind gezeigt.

	Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld (250-fache Vergrößerung)		
	10 µg/ml Gemcitabin	20 µg/ml Etoposid	10 µg/ml 5-FU
<b>Zytostatikum</b>	0,5	0,6	0,8
<b>+ mIgG1</b>			
1 µg/ml	0,5	4,1	0,8
5 µg/ml	0,6	1,8	1,2
10 µg/ml	0,5	3,7	1,2
<b>+ L1-9.3</b>			
1 µg/ml	0,7	6,7	1
5 µg/ml	0,5	2,5	0,8
10 µg/ml	0,7	4,5	0,4
<b>+ L1-14.10</b>			
1 µg/ml	0,6	1,8	0,8
5 µg/ml	1,3	6,4	0,6
10 µg/ml	0,1	6,7	1,2

Abbildung 16 zeigt repräsentative Aufnahmen der TUNEL-Färbung mit den PT45-P1res Zellen. Deutlich zu sehen sind die erhöhte Anzahl an braun gefärbten, apoptotischen Zellen nach Behandlung mit L1-9.3 oder L1-14.10 zusammen mit Gemcitabin oder Etoposid, wobei die Effekte in Kombination mit Etoposid ausgeprägter sind. Keine Erhöhung der apoptotischen Zellen ist jedoch nach Behandlung mit den Antikörpern und 5-Fluorouracil zu erkennen.



**Abbildung 16:** TUNEL-Assay mit PT45-P1res Zellen, die unbehandelt blieben oder einer Behandlung mit Gemcitabin, Etoposid oder 5-Fluorouracil alleine oder in Kombination mit je 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10 unterzogen worden waren. Je ein repräsentativer Ausschnitt pro Probe ist dargestellt. Vergrößerung x 250.

#### 4.2.2.2 Colo357 Zellen

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der TUNEL-Färbung der Colo357 Zellen dargestellt. In Kombination mit Gemcitabin zeigte jeweils die höchste Konzentration von L1-9.3 bzw. L1-14.10 den stärksten chemosensitivierenden Effekt. So wiesen Colo357 Zellen, die mit 10 µg/ml L1-9.3 und Gemcitabin behandelt wurden, durchschnittlich 6,2 apoptotische Zellen pro



Gesichtsfeld auf im Vergleich zu 5,1 in den Proben, die nur mit Gemcitabin allein bzw. 4,5 in den Proben, die mit Zytostatikum und Kontrollantikörper behandelt wurden. Die Kombinationsbehandlung mit 10 µg/ml L1-14.10 führte zu einer Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen auf 6,3 Zellen pro Gesichtsfeld.

In Kombination mit Etoposid zeigten beide L1CAM-spezifischen Antikörper den stärksten Effekt in der Konzentration von 5 µg/ml. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit L1-9.3 in dieser Konzentration steigerte die Anzahl an apoptotischen Zellen von durchschnittlich 1,9 auf 3,5 Zellen pro Gesichtsfeld und mit L1-14.10 wurde eine Erhöhung auf 3 Zellen pro Gesichtsfeld erzielt.

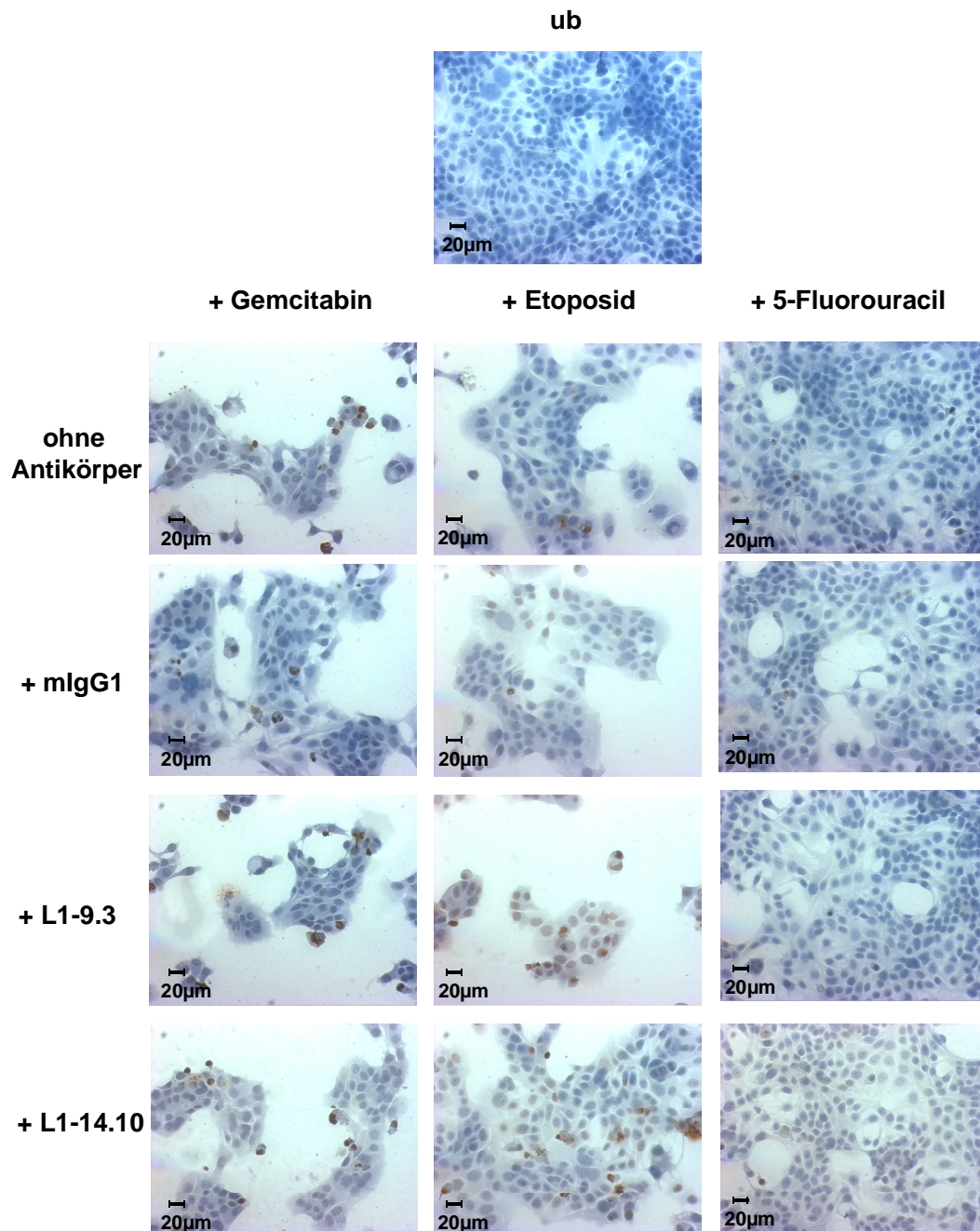
Wie auch bei den PT45-P1res Zellen führten beide Antikörper in Kombination mit 5-Fluorouracil zu keiner Erhöhung der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Behandlung mit dem Zytostatikum allein.

**Tabelle 2:** TUNEL-Färbung von Colo357 Zellen. Anzahl apoptotischer Colo357 Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin, Etoposid oder 5-Fluorouracil (5-FU) allein oder jeweils in Kombination mit einem Kontrollantikörper (mIgG1) oder einem L1CAM-spezifischen Antikörper. Ergebnisse von einem repräsentativen Versuch sind gezeigt.

	Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld (250-fache Vergrößerung)		
	10 µg/ml Gemcitabin	20 µg/ml Etoposid	10 µg/ml 5-FU
<b>Zytostatikum</b>	5,1	1,9	1,1
<b>+ mIgG1</b>			
1 µg/ml	5,3	1,6	1,1
5 µg/ml	4,8	1,2	0,6
10 µg/ml	4,5	1,7	0,4
<b>+ L1-9.3</b>			
1 µg/ml	2,0	1,5	0,3
5 µg/ml	5,6	3,5	0,5
10 µg/ml	6,2	2,5	0,1
<b>+ L1-14.10</b>			
1 µg/ml	4,6	1,9	0,1
5 µg/ml	5,4	3,0	0
10 µg/ml	6,3	2,5	0,2

Wie in den repräsentativen Aufnahmen der TUNEL-Färbung der Colo357 Zellen zu sehen ist (Abb. 17), kann durch die Kombination von L1CAM-spezifischen Antikörpern mit Gemcitabin bzw. Etoposid eine Zunahme an apoptotischen Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus ist in diesen Proben bereits ein deutlicher Verlust des Zellrasens zu

beobachten. In Kombination mit 5-Fluorouracil hingegen führten die Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinen Veränderungen.



**Abbildung 17:** TUNEL-Assay mit Colo357 Zellen, die unbehandelt blieben oder einer Behandlung mit Gemcitabin, Etoposid oder 5-Fluorouracil alleine oder in Kombination mit je 10 µg/ml mlgG1, L1-9.3 oder L1-14.10 unterzogen worden waren. Je ein repräsentativer Ausschnitt pro Probe ist dargestellt. Vergrößerung x 250.

Zusammenfassend untermauern die Ergebnisse des TUNEL-Assays die Befunde des Caspase-3/-7-Assays. Mit beiden L1CAM-spezifischen Antikörpern kann in den PDAC-Zelllinien eine Erhöhung des apoptotischen Ansprechens auf die Zytostatika Gemcitabin und Etoposid erzielt werden, nicht jedoch auf 5-Fluorouracil.

### 4.2.3 Bestimmung der Behandlungs-induzierten Apoptose mittels Annexin-V-FITC/Propidiumjodid-Färbung

Da auch nach wiederholten Versuchen und Modifikationen des Protokolls die TUNEL-Färbung beider Ovarialkarzinomzelllinien zu einer hohen unspezifischen Markierung der Zellen führte und somit eine korrekte und verlässliche Auswertung unmöglich machte, wurde dieses Verfahren nicht als zweite unabhängige Methode zur Apoptosebestimmung verwendet. Eine hohe proliferative oder metabolische Aktivität der Zellen könnte eine Erklärung für die hohe unspezifische Färbung sein.

Um dennoch die bisherigen Ergebnisse mit einer weiteren Methode zu bestätigen, erfolgte die Bestimmung der apoptotischen Ovarialkarzinomzellen mittels einer Annexin-V-FITC/Propidiumjodid-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie. Als apoptotische Zellen wurden ausschließlich Annexin-V-positive Zellen ausgewertet.

#### 4.2.3.1 OV-MZ-6 Zellen

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Annexin-V/Propidiumjodid-Färbung mit den OV-MZ-6 Zellen aufgeführt.

**Tabelle 3:** Annexin-V-FITC/PI-Färbung von OV-MZ-6 Zellen. Annexin-V-positive OV-MZ-6 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin oder Paclitaxel allein oder in Kombination mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Ergebnisse von einem repräsentativen Versuch sind gezeigt.

	Annexin-V positive Zellen in %	
	1 µg/ml Cisplatin	10 µg/ml Paclitaxel
<b>Zytostatikum</b>	22,9	37,7
<b>+ mIgG1</b>		
1 µg/ml	23,5	36,6
5 µg/ml	22,6	37,1
10 µg/ml	23,8	35,2
<b>+ L1-9.3</b>		
1 µg/ml	26,3	46,6
5 µg/ml	20	45,3
10 µg/ml	35,5	47,5
<b>+ L1-14.10</b>		
1 µg/ml	36,7	45,9
5 µg/ml	23,2	31,5
10 µg/ml	27,5	35,1

In Kombination mit Cisplatin führte die Behandlung mit 1 µg/ml L1-9.3 zu einer Steigerung Annexin-V-positiver Zellen um 11,9 %, mit 10 µg/ml L1-9.3 sogar zu einer Steigerung um 55 %. Der stärkste Effekt mit L1-14.10 konnte in der Konzentration von 1 µg/ml erzielt werden, und zwar eine Steigerung um 60 % von 22,9 % nach Behandlung mit Cisplatin allein auf 36,7 % nach Behandlung mit Zytostatikum und L1-14.10. Die zusätzliche Gabe der Kontrollantikörper beeinflusste hingegen das apoptotische Ansprechen der OV-MZ-6 Zellen auf Cisplatin nicht.

Die Behandlung mit Paclitaxel führte in Kombination mit dem spezifischen Antikörper L1-9.3 in allen drei Konzentrationen zu einer Zunahme Annexin-V-positiver Zellen um mindestens 20 % im Vergleich zu OV-MZ-6 Zellen, die nur mit Paclitaxel behandelt wurden. Der stärkste Effekt war hierbei nach zusätzlicher Behandlung mit 10 µg/ml L1-9.3 zu beobachten. Die kombinierte Behandlung aus Paclitaxel und 1 µg/ml L1-14.10 erhöhte die Anzahl Annexin-V-positiver Zellen um 21 % gegenüber Zellen, die nur einer Zytostatikabehandlung unterzogen worden waren. Zu einer Steigerung von 22 % führte die Behandlung von Paclitaxel zusammen mit 1 µg/ml L1-14.10.

#### **4.2.3.2 Skov3ip Zellen**

In den Skov3ip Zellen führten beide L1CAM-spezifischen Antikörper in Kombination mit Cisplatin zu einer Zunahme an Annexin-V positiven Zellen (Tabelle 4). Die Behandlung der Skov3ip Zellen mit 1 µg/ml L1-9.3 führte zu einem Anstieg apoptotischer Zellen um 49,6 %, die Kombination mit Kontrollimmunglobulinen in der gleichen Konzentration hingegen nur um 24 % gegenüber Zellen, die mit Cisplatin allein behandelt wurden. Die zusätzliche Stimulation mit dem Antikörper L1-14.10 zeigte ebenfalls in der Konzentration von 1 µg/ml den stärksten Effekt und erhöhte die Anzahl Annexin-V-positiver Zellen um 43,7 %.

In Kombination mit Paclitaxel erzielten beide L1CAM-spezifischen Antikörper deutlich stärkere Effekte auf das apoptotische Ansprechen der Zellen. Durch zusätzliche Gabe von L1-9.3 wurde eine Erhöhung der Annexin-V-positiven Zellen zwischen 34,2 % (bei 1 µg/ml) und 65 % (bei 5 µg/ml) erzielt. Die Kombination von Paclitaxel und L1-14.10 erhöhte die Anzahl apoptotischer Zellen sogar um 75 % in der Konzentration 5 µg/ml bzw. 102 % in der Konzentration von 10 µg/ml. Durch die Kontrollantikörper wurde das apoptotische Ansprechen der Skov3ip Zellen auf Paclitaxel nahezu nicht beeinflusst.

**Tabelle 4:** Annexin-V-FITC/PI-Färbung von Skov3ip Zellen. Annexin-V-positive Skov3ip Zellen nach Behandlung mit Cisplatin oder Paclitaxel allein oder in Kombination mit je 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml mIgG1, L1-9.3 oder L1-14.10. Ergebnisse von einem repräsentativen Versuch sind gezeigt.

	Annexin-V-positive Zellen in %	
	1 µg/ml Cisplatin	10 µg/ml Paclitaxel
<b>Zytostatikum</b>	13,5	15,2
<b>+ mIgG1</b>		
1 µg/ml	16,8	16
5 µg/ml	15,7	15,9
10 µg/ml	19,8	12,9
<b>+ L1-9.3</b>		
1 µg/ml	20,2	20,4
5 µg/ml	16,8	16,2
10 µg/ml	15,6	22,1
<b>+ L1-14.10</b>		
1 µg/ml	19,4	28,1
5 µg/ml	14,8	26,6
10 µg/ml	16,2	30,7

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Annexin-V-/Propidiumjodidfärbung als zweite Nachweismethode für Apoptose daraufhin, dass L1CAM-spezifische Antikörper das apoptotische Ansprechen von Ovarialkarzinomzellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung erhöhen, ein Effekt der vor allem in Kombination mit Paclitaxel zu beobachten ist.

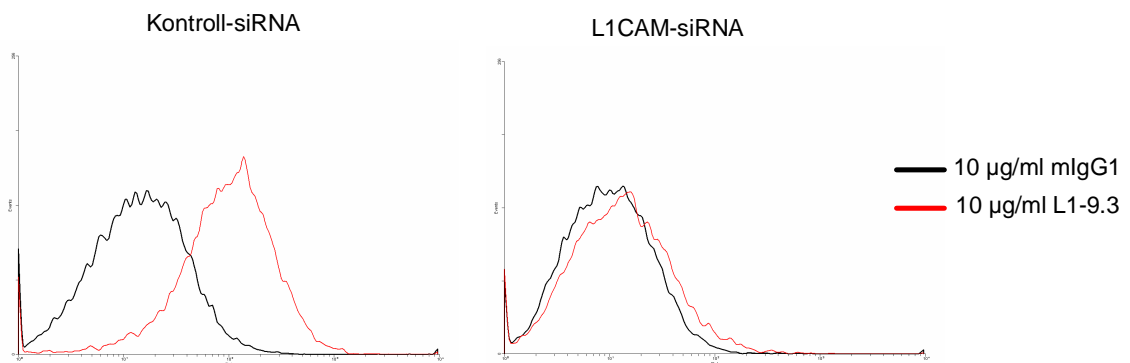
#### 4.3 Vergleich des chemosensitivierenden Effektes der siRNA-vermittelten Suppression und der Antikörper-vermittelten Blockade von L1CAM

Abschließend wurde untersucht, ob durch Einsatz der L1CAM-blockierenden Antikörper vergleichbare Effekte hinsichtlich der Chemosensitivierung zu erzielen sind wie durch siRNA-vermitteltem *knockdown* des Adhäsionsmoleküls.

Dafür erfolgte wie unter Punkt 3.5 beschrieben entweder die Transfektion mit einer L1CAM-spezifischen siRNA bzw. Kontroll-siRNA oder die Stimulation mit 10 µg/ml L1CAM-spezifischem Antikörper L1-9.3 bzw. 10 µg/ml Kontrollantikörper. Die Transfektionseffizienz und damit die Unterdrückung der L1CAM-Expression wurde durch eine L1CAM-Färbung mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen wurde ein Caspase-3/-7-Assay wie unter Punkt 3.3 beschrieben durchgeführt. Exemplarisch erfolgte die Behandlung mit Etoposid bei PDAC-Zelllinien bzw. mit Paclitaxel bei den Ovarialkarzinomzelllinien.

### 4.3.1 PT45-P1res Zellen

Während in Kontroll-siRNA transfizierten PT45-P1res Zellen nach Färbung mit dem L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3 eine deutlich Fluoreszenz-markierte Population von Zellen zu detektieren war, wiesen Zellen nach Transfektion mit der L1CAM-spezifischen siRNA und Färbung mit dem L1-9.3 Antikörper ähnlich viele Fluoreszenz-markierte Zellen auf wie Zellen, die mit dem Kontrollantikörper (mIgG1) gefärbt worden waren (Abb. 18).



**Abbildung 18:** siRNA-vermittelter *knockdown* der L1CAM-Expression in PT45-P1res Zellen. L1CAM-Färbung von PT45-P1res Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Transfektion von Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA. Die Zellen wurden mit je 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3 gefärbt. Dargestellt sind die Histogramme zu dem repräsentativen Versuch gezeigt in Tabelle 5.

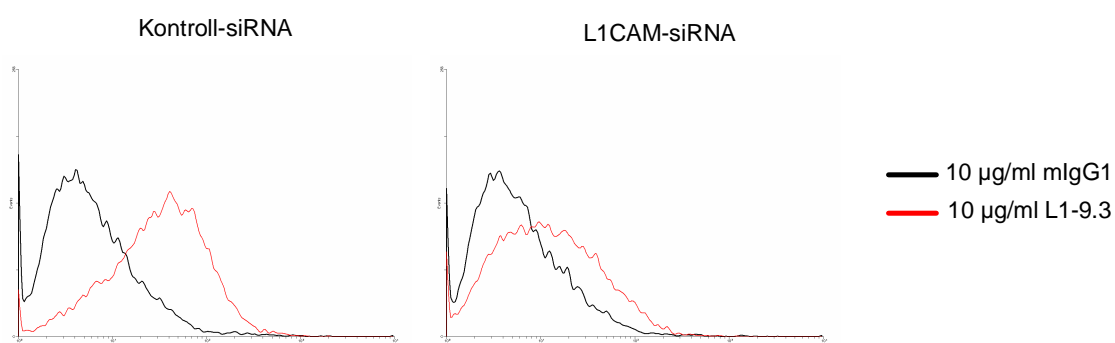
Wie in Tabelle 5 zu sehen ist, resultierte die Transfektion der PT45-P1res Zellen mit der L1CAM-spezifischen siRNA in einer Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität nach Etoposidbehandlung um das 2,2-fache im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Dieser Effekt war etwas stärker als derjenige nach Behandlung mit Etoposid und dem L1CAM-Antikörper L1-9.3. Diese Kombination führte zu einer Zunahme der Caspase-3/-7-Aktivität um das 1,8-fache im Vergleich zur Kostimulation mit dem Kontrollantikörper (von 0,86 auf 1,62-fach).

**Tabelle 5:** Caspase-3/-7-Aktivität nach siRNA-vermitteltem *knockdown* bzw. Antikörper-vermittelter Blockade von L1CAM und Behandlung mit Etoposid in PT45-P1res Zellen. Gezeigt ist die n-fache Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität bei PT45-P1res Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. L1CAM-spezifischer siRNA bzw. nach Behandlung mit 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3. Alle Zellen wurden zusätzlich mit 20 µg/ml Etoposid für 24 Stunden behandelt. Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs sind gezeigt.

Behandlung	n-fache Caspase-3/-7-Aktivität
Kontroll-siRNA + 20 µg/ml Etoposid	0,8
L1CAM-siRNA + 20 µg/ml Etoposid	1,8
10 µg/ml mIgG1 + 20 µg/ml Etoposid	0,8
10 µg/ml L1-9.3 + 20 µg/ml Etoposid	1,6

#### 4.3.2 Colo357 Zellen

Nach Transfektion mit der spezifischen L1CAM-siRNA konnte auch in Colo357 Zellen der Anteil Fluoreszenz-markierter Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe (Kontroll-siRNA) deutlich reduziert werden (Abb. 19).



**Abbildung 19:** siRNA-vermittelter *knockdown* der L1CAM-Expression in Colo357 Zellen. L1CAM-Färbung von Colo357 Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Transfektion von Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA. Die Zellen wurden mit je 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3 gefärbt. Dargestellt sind die Histogramme zu dem repräsentativen Versuch gezeigt in Tabelle 6.

Colo357 Zellen, die mit der L1CAM-spezifischen siRNA transfiziert worden waren, reagierten auf eine Behandlung mit Etoposid mit einer Zunahme der Caspase-3/-7-Aktivität um 94,3 % im Vergleich zu der Kontrollprobe, so dass sich die Caspase-3/-7-Aktivität von 0,88-fach auf 1,71-fach erhöhte (Tabelle 6). Die Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml L1-9.3 in Kombination mit Etoposid führte dagegen nur zu einer Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität um 24,4 % (Tabelle 6).

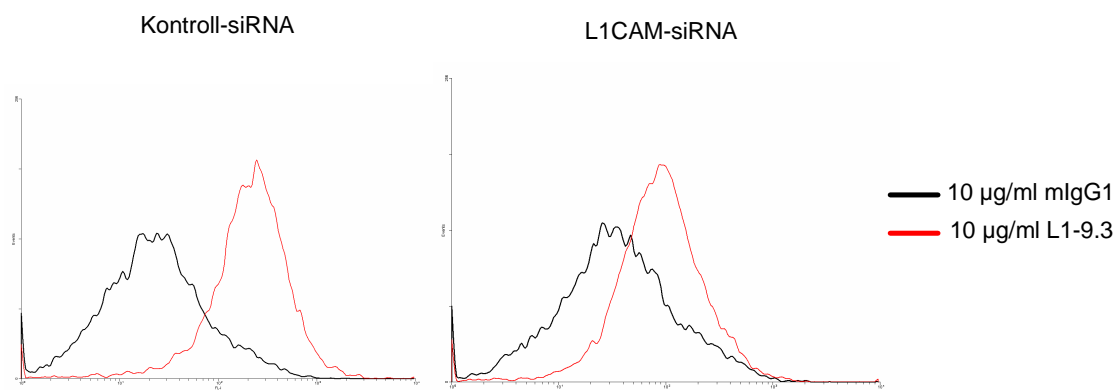
**Tabelle 6:** Caspase-3/-7-Aktivität nach siRNA-vermitteltem *knockdown* bzw. Antikörper-vermittelter Blockade von L1CAM und Behandlung mit Etoposid in Colo357 Zellen. Gezeigt ist die n-fache Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität bei Colo357 Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. L1CAM-spezifischer siRNA bzw. nach Behandlung mit 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3. Alle Zellen wurden zusätzlich mit 20 µg/ml Etoposid für 24 Stunden behandelt. Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs sind gezeigt.

Behandlung	n-fache Caspase-3/-7-Aktivität
Kontroll-siRNA + 20 µg/ml Etoposid	0,88
L1CAM-siRNA + 20 µg/ml Etoposid	1,71
10 µg/ml mIgG1 + 20 µg/ml Etoposid	1,31
10 µg/ml L1-9.3 + 20 µg/ml Etoposid	1,63

#### 4.3.3 OV-MZ-6 Zellen

Nach Transfektion mit der L1CAM-siRNA war der Anteil Fluoreszenz-markierter OV-MZ-6 Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen deutlich geringer (Abb. 20), wobei die Reduktion der L1CAM-Expression nicht so ausgeprägt war wie in den PDAC-Zelllinien.





**Abbildung 20:** siRNA-vermittelter *knockdown* der L1CAM-Expression in OV-MZ-6 Zellen. L1CAM-Färbung von OV-MZ-6 Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Transfektion von Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA. Die Zellen wurden mit je 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3 gefärbt. Dargestellt sind die Histogramme zu dem repräsentativen Versuch gezeigt in Tabelle 7.

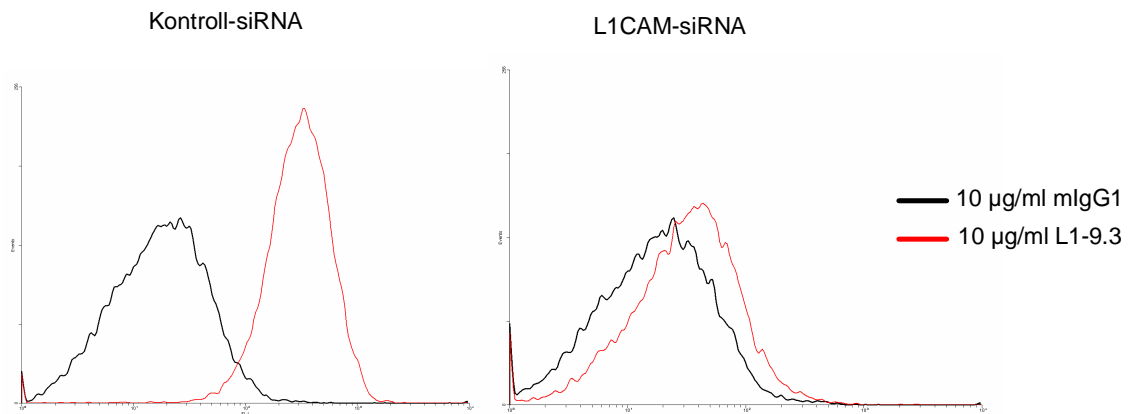
Wie in Tabelle 7 zu erkennen ist, führte die Transfektion der OV-MZ-6 Zellen mit der L1CAM-spezifischen siRNA im Vergleich zu der Kontroll-siRNA nur zu einer geringen Steigerung der Caspase-3/-7-Aktivität um 5,2 % von 2,71-fach auf 2,85-fach. Im Gegensatz dazu ließ sich durch Behandlung mit 10 µg/ml L1-9.3 in Kombination mit Paclitaxel eine Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität in OV-MZ-6 Zellen um 104 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erreichen (von 2,88 auf 5,89-fach).

**Tabelle 7:** Caspase-3/-7-Aktivität nach siRNA-vermitteltem *knockdown* bzw. Antikörper-vermittelter Blockade von L1CAM und Behandlung mit Paclitaxel in OV-MZ-6 Zellen. Gezeigt ist die n-fache Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität bei OV-MZ-6 Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. L1CAM-spezifischer siRNA bzw. nach Behandlung mit 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3. Alle Zellen wurden zusätzlich mit 5 µg/ml Paclitaxel für 24 Stunden behandelt. Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs sind gezeigt.

Behandlung	n-fache Caspase-3/-7-Aktivität
Kontroll-siRNA + 5 µg/ml Paclitaxel	2,71
L1CAM-siRNA + 5 µg/ml Paclitaxel	2,85
10 µg/ml mIgG1 + 5 µg/ml Paclitaxel	2,88
10 µg/ml L1-9.3 + 5 µg/ml Paclitaxel	5,89

#### 4.3.4 Skov3ip Zellen

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, führte der siRNA-vermittelte *knockdown* in den Skov3ip Zellen zu einer deutlichen Reduktion der L1CAM-Expression, so dass nach Anfärbung mit dem L1-9.3 Antikörper nur unwesentlich mehr Fluoreszenz-markierte Zellen zu detektieren waren als in den Proben, die mit dem Kontrollantikörper gefärbt worden waren.



**Abbildung 21:** siRNA-vermittelter *knockdown* der L1CAM-Expression in Skov3ip Zellen. L1CAM-Färbung von Skov3ip Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Transfektion von Kontroll-siRNA oder L1CAM-siRNA. Die Zellen wurden mit je 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3 gefärbt. Dargestellt sind die Histogramme zu dem repräsentativen Versuch gezeigt in Tabelle 8.

Die Transfektion mit der L1CAM-spezifischen siRNA führte in den Skov3ip Zellen im Gegensatz zu der entsprechenden Kontrollprobe zu einer Steigerung der Caspase-3/-7-Aktivität um 82 % nach Behandlung mit Paclitaxel (Tabelle 8). Im Gegensatz dazu wurde durch zusätzliche Stimulation der Skov3ip-Zellen mit 10 µg/ml L1-9.3 nur eine Zunahme der Caspase-3/-7-Aktivität nach Paclitaxel-Behandlung um 31 % erzielt verglichen mit Zellen, die zusätzlich mit Kontrollimmunglobulinen behandelt worden waren.

**Tabelle 8:** Caspase-3/-7-Aktivität nach siRNA-vermitteltem *knockdown* bzw. Antikörper-vermittelter Blockade von L1CAM und Behandlung mit Paclitaxel in Skov3ip Zellen. Gezeigt ist die n-fache Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität bei Skov3ip Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. L1CAM-spezifischer siRNA bzw. nach Behandlung mit 10 µg/ml mIgG1 oder L1-9.3. Alle Zellen wurden zusätzlich mit 10 µg/ml Paclitaxel für 24 Stunden behandelt. Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs sind gezeigt.

Behandlung	n-fache Caspase-3/-7-Aktivität
Kontroll-siRNA + 10 µg/ml Paclitaxel	1,14
L1CAM-siRNA + 10 µg/ml Paclitaxel	2,07
10 µg/ml mIgG1 + 10 µg/ml Paclitaxel	5,82
10 µg/ml L1-9.3 + 10 µg/ml Paclitaxel	7,62

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass durch Suppression der L1CAM-Expression mittels siRNA eine stärkere Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität nach Zytostatikabehandlung in den Tumorzelllinien zu erzielen ist als nach Antikörper-vermittelter Blockade von L1CAM. Diese Effekte setzen jedoch eine optimale Transfektionseffizienz voraus. Wenn diese nicht erzielt wird, wie z.B. im Fall der OV-MZ-6 Zellen, so sind die Effekte durch die Antikörperblockade ausgeprägter.

## 5. Diskussion

Nach wie vor stellt die Therapie des PDAC und des Ovarialkarzinoms eine große Herausforderung dar. Mangelnde Vorsorgeuntersuchungen und unspezifische bis fehlende Frühsymptome führen dazu, dass beide Tumorerkrankungen meist erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert werden. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben sowohl das PDAC als auch das Ovarialkarzinom in vielen Fällen bereits benachbarte Organe und Gefäße infiltriert und hämatogen metastasiert.

Ein weiteres Problem in der Behandlung der Tumorerkrankungen liegt in der ausgeprägten Resistenz gegenüber Chemotherapien. Gemcitabin als Standardtherapie für das PDAC und ein Platinderivat in Kombination mit Paclitaxel in der Behandlung des Ovarialkarzinoms können die Überlebensraten jeweils nur mäßig verlängern. Beide Tumorentitäten besitzen umfassende Mechanismen, um sich der zytostatischen Therapie zu entziehen und haben daher nach wie vor eine infauste Prognose. [Lillemoe et al. 2000; Cannistra et al. 2004; Li et al. 2004; Stordal et al. 2007]. Das Überwinden dieser Resistenzmechanismen stellt daher eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung des therapeutischen Ansprechens dieser beiden hoch-malignen Tumoren und damit zur Verbesserung der Prognose für die Patienten dar.

In den letzten Jahren wurde das Adhäsionsmolekül L1CAM in unterschiedlichen Tumorentitäten u.a. im Kolonkarzinom [Kaifi et al. 2007], malignen Melanom [Fogel et al. 2003a] sowie im PDAC [Sebens Mürköster et al. 2007; Ben et al. 2010; Bergmann et al. 2010; Chen et al. 2010; Tsutsumi et al. 2011] und Ovarialkarzinom [Fogel et al. 2003b] nachgewiesen. Die Expression von L1CAM konnte dabei mit verschiedenen Tumor-assoziierten Prozessen wie Migration [Fogel et al. 2003b; Gavert et al. 2005], Proliferation [Arlt et al. 2006] und Apoptoseresistenz [Sebens Mürköster et al. 2007; Stoeck et al. 2007] in Verbindung gebracht werden. Während L1CAM physiologisch im neuronalen Gewebe exprimiert wird und dort maßgeblich an der Entwicklung und dem Wachstum beteiligt ist, wird die Anwesenheit von L1CAM in tumorösem Gewebe meist mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer schlechten Prognose assoziiert [Raveh et al. 2009; Ben et al. 2010; Tsutsumi et al. 2011]. Im PDAC wurde L1CAM vorzugsweise an der invasiven Front gefunden, wo es mit einem schlechten histologischen *grading*, einem positiven Lymphknotenstatus, einer frühen Fernmetastasierung sowie einer kurzen Überlebenszeit korreliert [Ben et al. 2010; Tsutsumi et al. 2011]. Patienten mit L1CAM negativem PDAC

wiesen dabei im Vergleich zu Patienten mit L1CAM positiven Tumoren ein signifikant längeres Gesamtüberleben auf (15 Monate versus 8,5 Monate) [Ben et al. 2010]. Die L1CAM-Expression in Tumorgefäßen und Tumoren der glatten Muskulatur konnte durch ein möglicherweise verstärktes *attachment* der Tumorzellen über homophile Bindungen an die umgebende Matrix erklärt werden [Allory et al. 2005; Kaifi et al. 2006]. Aufgrund der zunehmenden Bedeutung in der Tumorgenese und der kurzen Überlebenszeit wird L1CAM in neueren Studien auch als möglicher Prognosemarker im PDAC diskutiert [Tsutsumi et al. 2011].

Neben der Membran-gebundenen Form konnte lösliches L1CAM in Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen detektiert werden [Fogel et al. 2003b]. Da L1CAM in diesen Patientinnen stadienabhängig exprimiert wird und einen guten Prediktor für die Diagnose darstellt, wurde über die Verwendung von L1CAM als diagnostischen Marker für das Ovarialkarzinom bereits früher schon diskutiert [Fogel et al. 2003b]. Fogel et al. konnten zeigen, dass die durch ADAM-10 vermittelte Spaltung von L1CAM über eine Erhöhung der Zellmigration die Tumordisseminierung fördert [Fogel et al. 2003b]. Dabei scheint die Bindung von löslichem L1CAM an Integrine wie z.B.  $\alpha\beta 5$ -Integrin entscheidend zu sein [Beer et al. 1999; Gutwein et al. 2000; Mechtersheimer et al. 2001]. Darüber hinaus kann lösliches L1CAM durch spezifische Bindung an Laminin im Tumor-umgebenden Gewebe immobilisiert werden und als zusätzliches potentes Substrat für die Zellmigration wirken [Montgomery et al. 1996]. Im PDAC konnte löslichem L1CAM jedoch bisher keine Rolle zugesprochen werden, was u.a. durch den Befund unterstützt wird, dass in Seren von PDAC-Patienten die lösliche Form nicht zu detektieren war [Bergmann et al. 2010].

Da L1CAM ein Protein ist, das bis auf Zellen des neuronalen Systems vornehmlich von Tumorzellen stark exprimiert wird und es offenbar in zahlreichen Prozessen der Tumorprogression, u.a. der Vermittlung von Apoptoseresistenz eine wichtige Rolle zu spielen scheint, war Ziel dieser Arbeit, das therapeutische Potential von L1CAM-blockierenden Antikörpern in PDAC- und Ovarialkarzinomzellen im Hinblick auf ihre chemosensitivierende Wirkung zu evaluieren und für den Einsatz in präklinischen Studien zu identifizieren. Es wurden zunächst vier L1CAM-spezifische Antikörper, die kürzlich von Wolterink et al. beschrieben wurden, auf ihre Bindungsfähigkeit in PDAC- und Ovarialkarzinomzelllinien getestet. Alle Antikörper erkennen Bindungsstellen im extrazellulären Anteil des Moleküls, wobei die Antikörper L1-38.12 und L1-9.3 an die 1. Immunglobulin-Domäne binden,

während L1-14.10 die 3. und L1-35.9 die 6. Immunglobulin-Domäne erkennen [Wolterink et al. 2010].

Um die Bindungsfähigkeit der anti-L1CAM-Antikörper an das membranständige L1CAM-Molekül auf den Tumorzellen zu überprüfen - eine Voraussetzung für ihre therapeutische Wirkung (wegen eventueller indirekter Effekte) - wurde zunächst eine L1CAM-Färbung der PDAC-Zelllinien PT45-P1res und Colo357 sowie der beiden Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und Skov3ip mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei zeigten die Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 im Vergleich zu Kontrollimmunglobulinen eine deutlich erhöhte Bindungsfähigkeit bei allen vier Tumorzelllinien, wobei mit dem L1-9.3 die stärkste Anfärbbarkeit der Zellen erzielt wurde. Die Antikörper L1-35.9 und L1-38.12 wiesen im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe keine erhöhte Bindungsaffinität bei allen Zelllinien auf. Obwohl der L1-35.9 Antikörper in anderen Studien gute  $K_d$ -Bindungswerte aufwies [Wolterink et al. 2010] und im Western Blot eine deutliche Bindungsreaktivität bei Tumorzelllinien zeigte, kann die Nichtanfärbbarkeit von L1CAM auf den PDAC- und Ovarialkarzinomzelllinien in der durchflusszytometrischen Analyse möglicherweise dadurch erklärt werden, dass auf der Zelloberfläche bestimmte Epitope versteckt und somit nicht für den Antikörper zugänglich sind [Wolterink et al. 2010]. Die Beobachtung, dass der L1-38.12 Antikörper kein endogenes L1CAM auf Tumorzelllinien erkennt, bestätigt Befunde von Wolterink et al., die zeigten, dass dieser Antikörper in Gewebeschnitten von Ovarialkarzinomen nicht die Tumorzellen, wohl aber periphere Nervenfasern markiert. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass es zum einen eine neuronale und eine tumoröse Form des L1CAM gibt und zum anderen, dass dieser Antikörper preferenziell eher die neuronale Form nicht aber die tumoröse Form erkennt. In der Tat wurden von verschiedenen Gruppen bereits unterschiedliche Splice-Varianten von L1CAM beschrieben, wobei Tumorzellen vornehmlich die Variante exprimieren, in der Exon 2 und 27 fehlt [Reid et al. 1992; Takeda et al. 1996]. Da sowohl mit dem L1-35.9 als auch mit dem L1-38.12 Antikörper keine Detektion von Membran-ständigem L1CAM auf allen vier Tumorzelllinien zu erzielen war, wurden diese beiden Antikörper für eine therapeutische Nutzung nicht weiter in Betracht gezogen und in den nachfolgenden Versuchen nicht mehr eingesetzt.

Zur Evaluierung des chemosensitivierenden und Apoptose-induzierenden Potentials der L1CAM-Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 wurde als Standardmethode eine Messung der Caspase-3/-7-Aktivität durchgeführt. Behandelt wurden die PT45-P1res und Colo357 Zellen mit den in der Klinik verwendeten Standardzytostatika in Kombination mit den spezifischen L1CAM-Antikörpern. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die

Interferenz von Signalwegen, die essentiell am Apoptoseschutz von Tumorzellen beteiligt sind, zu einer besonders starken Sensitivierung gegenüber Etoposid führt. So wurde beobachtet, dass der NF- $\kappa$ B Inhibitor Sulfasalazin zu einer deutlich stärkeren Erhöhung des apoptotischen Ansprechens von PDAC-Zellen gegenüber Etoposid führt als die Kombination mit Gemcitabin [Arlt et al. 2001; Mürköster et al. 2003]. Daher wurden die PDAC-Zelllinien neben Gemcitabin und 5-Fluorouracil auch einer Behandlung mit Etoposid unterzogen und die Effekte der L1CAM-blockierenden Antikörper in Kombination mit diesem Zytostatikum überprüft.

Wie mittels Messung der Caspase-3/-7-Aktivität gezeigt werden konnte, führten die Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 in beiden PDAC-Zelllinien zu einer Sensitivierung gegenüber Gemcitabin und damit einer signifikant erhöhten Caspase-3/-7-Aktivität nach dieser Kombinationsbehandlung im Vergleich zu einer Behandlung mit Gemcitabin allein. Es konnte eine Steigerung der Caspase-3/-7-Aktivität zwischen 56 % (mit 10  $\mu$ g/ml L1-14.10 in PT45-P1res Zellen) und 93 % (mit 1  $\mu$ g/ml L1-9.3 in PT45-P1res Zellen) erzielt werden. Ebenfalls führte die Behandlung beider PDAC-Zelllinien mit einer Kombination aus L1CAM-spezifischen Antikörpern und Etoposid zu einer verstärkten Apoptoseinduktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe. In dieser Kombination wurde eine Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität zwischen 63 % (mit 5  $\mu$ g/ml L1-14.10 in PT45-P1res Zellen) und 73,5 % (mit 5  $\mu$ g/ml L1-14.10 in Colo357 Zellen) erzielt. In Kombination mit 5-Fluorouracil zeigten beide L1CAM-Antikörper hingegen keine signifikanten Effekte auf die Caspase-3/-7-Aktivität. Die Befunde der Caspase-3/-7-Assays konnten weitestgehend mittels des TUNEL-Assays, der als zweite Methode zur Bestimmung der Apoptoseinduktion verwendet wurde, bestätigt werden. Etwas divergierende Ergebnisse wurden mit beiden Messmethoden in den PT45-P1res Zellen beobachtet. Im Caspase-3/-7-Assay wurden die stärksten sensitivierenden Effekte gegenüber Gemcitabin in Kombination mit 1  $\mu$ g/ml L1-9.3 zur Behandlung der PT45-P1res Zellen und in Kombination mit Etoposid mit 5  $\mu$ g/ml L1-14.10 zur Behandlung der Colo357 Zellen erzielt. Im TUNEL-Assay hingegen konnten die meisten apoptotischen Zellen nach Behandlung von Gemcitabin und 5  $\mu$ g/ml L1-14.10 sowie von Etoposid mit 5  $\mu$ g/ml L1-14.10 in PT45-P1res Zellen detektiert werden. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass bereits in der Antikörperkonzentration von 1  $\mu$ g/ml eine sehr gute Markierung von L1CAM auf der Oberfläche aller verwendeten Zelllinien zu beobachten war. Mit den beiden höheren Konzentrationen konnte der Anteil der Fluoreszenz-markierten Zellen zwar noch weiter erhöht werden, wobei jedoch kein Unterschied zwischen 5  $\mu$ g/ml und 10  $\mu$ g/ml mehr zu verzeichnen war. Daher ist auch zu erklären, dass die stärksten chemosensitivierenden

Effekte sowohl in den PDAC- als auch in den Ovarialkarzinomzelllinien überwiegend mit beiden L1CAM-Antikörpern in den Konzentrationen 5 und 10 µg/ml erzielt wurden.

Unterschiedliche Wirkmechanismen der Zytostatika und verschiedene *Escape*-Mechanismen der PDAC-Zellen können als Erklärung gesehen werden, dass die Blockade von L1CAM das apoptotische Ansprechen auf Gemcitabin und Etoposid, nicht aber auf 5-Fluorouracil zu erhöhen vermochte. Im PDAC sind neben veränderten Apoptosesignalwegen weitere Mechanismen beschrieben, die zur Vermittlung von Chemoresistenz in diesen Tumorzellen beitragen können. So scheint für die Resistenz von PDAC Zellen gegenüber 5-Fluorouracil besonders MRP5 von Bedeutung zu sein. MRP5 gehört ebenso wie MRP2 zu der Gruppe der ABC-Transporter und transportiert als Efflux-Pumpe 5-Fluorouracil über die zelluläre Plasmamembran aus der Tumorzelle heraus. In vielen Fällen führt eine längerfristige Behandlung mit 5-Fluorouracil zu einer gesteigerten MRP5-Expression mit konstitutiver Ausbildung eines chemoresistenten Phänotyps [Hagmann et al. 2009]. Die Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil scheint daher in den PDAC-Zellen weniger durch L1CAM als durch andere Resistenzmechanismen wie z.B. durch eine aberrante Expression von MRP-Proteinen [Hagmann et al. 2009] vermittelt zu werden. Aufgrund dieser Befunde ist jedoch für die präklinische Testung und für die klinische Anwendung eine Therapie aus L1CAM-Antikörper mit Gemcitabin (oder auch Etoposid) einer Kombinationstherapie mit 5-Fluorouracil vorzuziehen.

Als Standard *readout*-Verfahren zur Überprüfung des chemosensitivierenden Potentials der L1CAM-Antikörper bei der Behandlung von Ovarialkarzinomzelllinien wurde ebenfalls die Messung der Caspase-3/-7-Aktivität durchgeführt.

Als zweite unabhängige Methode zur Bestimmung der Apoptoserate als Maß für die Chemosensitivierung eignete sich die TUNEL-Färbung für die Ovarialkarzinomzelllinien hingegen nicht. OV-MZ-6 und Skov3ip Zellen wiesen auch nach multiplen Veränderungen des Testprotokolls eine hohe unspezifische Anfärbung auf, sodass apoptotische Zellen nicht sicher von Zellen mit hoher metabolischer Aktivität unterschieden werden konnten. Daher wurde als zweite Methode zur Überprüfung der Apoptoseinduktion eine Annexin-V-FITC/PI-Färbung durchgeführt. Die Bestimmung der Caspase-3/-7-Aktivität ergab, dass weder die zusätzliche Behandlung mit L1-14.10 noch mit L1-9.3 zu einer verstärkten Apoptoseantwort auf Cisplatin in Skov3iP Zellen führte. In OV-MZ-6 Zellen wurden zwar Effekte mit 10 µg/ml L1-9.3 sowie mit 1 µg/ml L1-14.10 beobachtet, diese waren jedoch nicht statistisch signifikant. In Kombination mit Paclitaxel wurde eine Erhöhung der Caspase-3/-7-Aktivität in Skov3ip Zellen zwischen 20 % mit 10 µg/ml L1-9.3 und 41 % mit 5 µg/ml L1-14.10 erzielt.



Mit der Annexin-V-FITC/PI-Färbung konnten die Effekte beider L1CAM-Antikörper in Kombination mit Paclitaxel untermauert werden. Im Gegensatz zu den Befunden im Caspase-3/-7-Assay führte die Kombination aus Cisplatin jedoch mit einem der beiden L1CAM-Antikörper zu einer Erhöhung der Annexin-V positiven Zellen und damit zu einer Steigerung an apoptotischen Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zur Behandlung mit Cisplatin allein. Eine Erklärung für diese divergierenden Befunde könnte sein, dass die Apoptoseinduktion durch Cisplatin in diesen Zellen unabhängig von der Aktivierung von Caspasen abläuft wie dieses bereits für Prostata- und Lungenkarzinomzellen beschrieben wurde [Zhang et al. 2007; Liu et al. 2009].

Wie in PDAC-Zellen stellt die Dysregulation der Apoptoseinduktion in Ovarialkarzinomzellen einen wichtigen Mechanismus bei der Vermittlung von Chemoresistenz dar. Aber auch diese Tumorzellen entwickeln darüber hinaus eine Vielzahl von anderen Strategien, um sich der Wirkung von Chemotherapeutika zu entziehen, wobei eine aberrante Expression von ABC-Transportermolekülen hierbei eine wichtige Rolle einnimmt. Cisplatin und Carboplatin sind beides Substrate des ABC-Transporters MRP2, der in vielen Platin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinien überexprimiert wird [Materna et al. 2004]. Insbesondere die Lokalisation des Transporters in der Kernmembran scheint hierbei mit dem Maß an Platin-Resistenz zu korrelieren [Surowiak et al. 2006]. Die Konjugation der Platin-haltigen Substanzen an Glutathion in Ovarialkarzinomzelllinien führt zur Inaktivierung des Zytostatikums. Cisplatin und Carboplatin werden vorzugsweise konjugiert als Zytostatikum-Glutathion-Komplex über den MRP2 aus der Zelle geschleust, sodass in Platin-resistenten Karzinomen hohe Level an Glutathion S-Transferase, dem Katalysator der Konjugation, gefunden werden [Materna et al. 2005]. Platin-haltige Zytostatika vermitteln ihre zytotoxischen Effekte über Platin-DNA-Verbindungen, die zu einer Induktion zellulärer Todessignalwege führen [Lage, Denkert 2007]. Daher kann auch eine Zunahme von DNA-Reparaturmechanismen z.B. eine verstärkte *nucleotide excision* Reparatur (NER) [Dijt et al. 1988] oder eine erhöhte Aktivität an *DNA mismatch repair* (MMR) Systemen [Lage, Dietel 1999] zusätzlich zur Chemoresistenz beitragen.

Eine andere Erklärung für die Beobachtung, dass die Blockade von L1CAM nicht zu einer Verstärkung der Cisplatin-induzierten Apoptoseantwort führte, könnte daher sein, dass die Resistenz gegenüber Cisplatin in Ovarialkarzinomzellen weniger durch L1CAM vermittelt wird als durch einen oder mehrere der oben genannten Mechanismen.

Wie bei den PDAC-Zelllinien waren die stärksten Effekte auf die Zytostatika-induzierte Apoptoseinduktion mit beiden L1CAM-Antikörpern in den Konzentrationen 5 und 10 µg/ml

zu beobachten, was damit zu erklären ist, dass durch die höchste Konzentration keine stärkere Oberflächendetektion zu erzielen war als mit 5 µg/ml. Sowohl bei den PDAC- als auch den Ovarialkarzinomzelllinien wurden jedoch auch gewisse Effekte durch die zusätzliche Gabe der Kontroll-IgG-Antikörper beobachtet. Obwohl durch diese in der Färbung und anschließenden durchflusszytometrischen Analyse keine Bindung an den Tumorzellen detektiert werden konnte, scheinen die Inkubationsbedingungen, unter denen die Versuche zur Bestimmung der Apoptoserate durchgeführt wurden (25 Stunden bei 37°C für die Bestimmung der Apoptoserate versus 30 Minuten auf Eis für die Färbung) die Bindungsaffinität der Kontrollantikörper an die Tumorzellen zu erhöhen.

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die siRNA-vermittelte Unterbindung der L1CAM-Expression in PT45-P1res Zellen mit einer signifikant erhöhten Caspase-3/-7-Aktivität nach Zytostatikagabe einhergeht [Sebens Muerköster et al. 2007]. Um die Effektivität der Antikörper mit der siRNA-vermittelten Hemmung von L1CAM hinsichtlich ihrer chemosensitivierenden Wirkung zu vergleichen, wurde die L1CAM-Expression mittels Transfektion von spezifischer siRNA unterbunden. Die L1CAM-Färbung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie ergab bei den PT45-P1res, Colo357 und Skov3ip Zellen deutlich reduzierte L1CAM-Expressionslevel nach Transfektion mit der L1CAM-spezifischen siRNA verglichen mit der Kontroll-siRNA. Die anschließende Messung der Caspase-3/-7-Aktivität ergab, dass der siRNA-vermittelte knockdown von L1CAM der Antikörper-vermittelten Blockade des Moleküls hinsichtlich der chemosensitivierenden Wirkung überlegen war. Dieser Befund lässt sich dadurch erklären, dass die Unterdrückung der Genexpression mittels siRNA Transfektion zu einer effizienteren Inhibition/Blockade des Moleküls führt und diese möglicherweise auch über eine längere Zeit bestehend bleibt als eine Antigen-Antikörper-Bindung. Nur die OV-MZ-6 Zellen zeichneten sich durch eine schlechtere Transfizierbarkeit aus, sodass diese Zellen auch nach Transfektion mit der spezifischen siRNA eine gewisse L1CAM-Expression aufwiesen. Daher sprachen die OV-MZ-6 Zellen in einem höheren Maß auf die Behandlung mit dem Antikörper L1-9.3 in Kombination mit Paclitaxel im Vergleich zu der siRNA Behandlungskombination an, was durch die geringe Transfektionseffizienz der siRNA in diesen Zellen zu erklären sein mag. Obwohl diese Versuche eine gewisse Überlegenheit der siRNA gegenüber einer Antikörper-basierten Therapie aufzeigen, ist letztere aufgrund ihrer zusätzlichen immunmodulatorischen Effekte (siehe unten) – wie schon bei vielen anderen Tumorerkrankungen - im Fall einer Therapie mit L1CAM als Zielstruktur zu bevorzugen.

In den letzten Jahren hat sich die Antikörper-basierte Therapie in der Behandlung von einigen Tumorerkrankungen, z.B. des Non-Hodgkin Lymphoms oder des Mammakarzinoms bereits in der Klinik etabliert [Oldham et al. 2008]. Monoklonale Antikörper (mAK) interagieren dabei mit den Zielzellen/-strukturen (z.B. CD20, HER-2/neu, VEGF) und wirken synergistisch mit oder ersetzen sogar konventionelle Chemotherapien [Brekke et al. 2003; Glennie et al. 2003].

Da L1CAM im Gesunden vornehmlich auf neuronalen Zellen exprimiert wird, ist ein Übertritt von L1CAM-Therapeutika in das Hirnparenchym zu vermeiden. Aufgrund ihrer Größe können Immunglobuline nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, sodass bei einer therapeutischen Anwendung von L1CAM-Antikörpern mit allenfalls geringen unerwünschten Nebenwirkungen zu rechnen ist, weshalb die Antikörper einer Behandlung mit den viel kleineren siRNA-Molekülen vorzuziehen sind. Die Behandlung von Mäusen [Arlt et al. 2006] und Cynomolgus-Affen (unveröffentlichte Ergebnisse) führte bisher in den Tieren zu keinerlei Nebenwirkungen. In den tumortragenden Tieren konnte darüber hinaus eine selektive Anreicherung der Antikörper in den Tumoren, aber nicht in anderen Geweben [Arlt et al. 2006] beobachtet werden. Insgesamt weisen einige präklinische Studien bereits auf das therapeutische Potential von L1CAM-Antikörpern in der Krebstherapie hin (siehe unten).

Neben Proliferation und Migration spielt L1CAM eine große Rolle in der Vermittlung von Chemoresistenz [Sebens Muerköster et al. 2007; Stoeck et al. 2007; Geismann et al. 2009]. Daher und aufgrund der restriktiven Expression im Gesunden [Raveh et al. 2009] stellt das Tumor-exprimierte L1CAM eine vielversprechende Zielstruktur für eine Antikörper-basierte Therapie dar. Die monoklonalen anti-L1CAM-Antikörper vermitteln ihre proliferations- und migrationshemmende sowie pro-apoptotische Wirkung u.a. über eine Blockade der Interaktion von L1CAM und Integrinen. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von  $\alpha 5$ - und  $\alpha v$ -Integrinen an L1CAM zu einer Hochregulation der IL-1 $\beta$ -Expression in PDAC-Zellen führt [Kiefel et al. 2010]. Diese wiederum scheint unentbehrlich für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der Vermittlung von Chemoresistenz zu sein [Arlt et al. 2002]. In den PT45-P1res Zellen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der  $\alpha 5$ -Integrin-Bindungsstellen im L1CAM-Molekül zu einer Verminderung der iNOS-Expression und dieses wiederum zu einer Reduktion der NO-Level führt. In Folge dessen wurde die NO-vermittelte Nitrosylierung und damit Inhibition verschiedener Caspasen aufgehoben, was in einem besseren apoptotischen Ansprechen gegenüber Zytostatika resultierte [Sebens Muerköster et al. 2006, 2009].

Ferner zeigten *in vitro* Versuche an SKOV3ip-Zellen, dass die Wirkung des monoklonalen L1CAM-Antikörpers chCE7 durch Zugabe von Genistein verstärkt werden kann [Novak-Hofer et al. 2008]. In Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein konnten die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekte des chCE7 potenziert werden. Zusätzlich nahm die Sensitivität der Erk-, Src- und Akt-Kinasen auf eine extrazelluläre Stimulation mit Wachstumsfaktoren deutlich ab [Novak-Hofer et al. 2008].

Darüber hinaus konnten Arlt et al. *in vivo* demonstrieren, dass eine Behandlung mit L1CAM-Antikörpern zu einer substantiellen und Dosis-abhängigen Inhibition von Tumorwachstum, Disseminierung und Aszitesbildung führte. Die Behandlung von Ovarialkarzinom-tragenden Nacktmäusen mit dem Antikörper L1-11A führte dabei zu einer Reduktion der Tumorlast um 63,5 % und zu einer Reduktion der Aszitesbildung um 75 % [Arlt et al. 2006]. Zusätzlich konnte die Antikörpertherapie mit einem verbesserten Gesundheitsstatus der Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe assoziiert werden. Die Verteilung der Tumorzellen im Peritoneum blieb nach Behandlung mit anti-L1CAM-Antikörpern im Vergleich zu der Kontrollgruppe zwar unverändert, die Tumormasse war allerdings deutlich reduziert [Arlt et al. 2006]. Eine Erklärung hierfür könnte die durch die Behandlung veränderte Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen an Gewebeoberflächen und Karzinomzellen sein.

In Gliomzellen scheint L1CAM ein Marker für Tumorstammzellen und damit eine vielversprechende Zielstruktur zu sein, um das Wachstum dieser Tumore zu unterdrücken. Bao et al. konnten zeigen, dass durch Unterdrückung der L1CAM-Expression in CD133-exprimierenden Glioblastomzellen, die aus humanem Tumormaterial isoliert wurden, das Auswachsen von Tumoren in immundefizienten Mäusen verhindert wurde, wohingegen die Inokulation von CD133+L1CAM+ Tumorzellen zu einem Tumorwachstum führte [Bao et al. 2008]. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass L1CAM eine therapeutische Zielstruktur darstellt, über die auch Tumorstammzellen, die als besonders therapieresistent gesehen werden, eliminiert werden können, was möglicherweise das Auftreten von Rezidiven deutlich vermindern könnte.

Neben der Unterdrückung von Zellmigration/Tumorzelldisseminierung, Tumorwachstum und Zytostatikaresistenz, kann über die Blockade von L1CAM in Tiermodellen sowie in Patienten ein zusätzlicher Therapieeffekt durch die Antikörper abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*ADCC = antibody dependent cellular cytotoxicity*) erwartet werden. Hierbei werden Tumorzellen durch Bindung der Antikörper an das L1CAM für Zellen des Immunsystems, z.B. Natürliche Killer (NK-) Zellen markiert und durch diese zerstört. Binden NK-Zellen über ihre Fc-Rezeptoren (u.a. CD16) an den Fc-Teil der L1CAM-Antikörper auf den Tumorzellen,

so kommt es zur Freisetzung von zytotoxischen Substanzen wie Perforin oder Granzymen und damit zur Induktion von Zelltod in den Tumorzellen [von Mensdorff-Pouilly 2010].

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist bereits begonnen worden, die Wirksamkeit der beiden L1CAM-Antikörper L1-9.3 und L1-14.10 in Kombination mit Zytostatika *in vivo* zu überprüfen. Dabei wurden die beiden Antikörper bzw. die Kontrollantikörper jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10 mg/kg Körpergewicht) eingesetzt. Immundefiziente Mäuse, die entweder mit Colo357 oder PT45-P1res Zellen subkutan inokuliert worden waren, wurden dabei entweder mit Gemcitabin allein oder in Kombination mit den Antikörpern behandelt. Tiere, die OV-MZ-6 bzw. Skov3ip Tumore aufwiesen, wurden entsprechend der *in vitro* Befunde mit Paclitaxel alleine oder in Kombination mit den Antikörpern behandelt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten im Rahmen von umfassenden *in vivo* Versuchen untermauert und erweitert werden. So konnte gezeigt werden, dass in Colo357 und Skov3ip Tumor tragenden Tieren nach Behandlung mit Gemcitabin und 10 mg/kg L1-14.10 bzw. L1-9.3 eine signifikante Tumorreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden kann. Diese Befunde spiegeln sich in einer signifikant gesteigerten Anzahl an apoptotischen Zellen in den Tumoren in der immunhistochemischen Analyse wieder [Schäfer et al. 2012]. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten [Arlt et al. 2006] zeigte sich in der Ki67-Färbung ein allenfalls marginaler Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Zellproliferation, sodass die anti-Tumor Effekte in diesen Tumormodellen weniger auf einer Proliferationshemmung als auf einer Apoptoseinduktion beruhen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit L1CAM Antikörpern zu einer verminderten VEGF-Expression und - damit einhergehend - zu einer geringeren Blutgefäßdichte führt [Schäfer et al. 2012]. Zumindest in Colo357 Tumoren wirkte die Antikörper-vermittelte L1CAM-Blockade hemmend auf NF- $\kappa$ B, was eine Erklärung für die reduzierte Expression von VEGF sowie die erhöhte Apoptoseinduktion sein kann [Schäfer et al. 2012]. Als weiterer Mechanismus für die reduzierte Blutgefäßdichte, insbesondere in Skov3ip Tumoren, wird die Wirkung von L1CAM Antikörpern auf L1CAM-vermittelte pro-angiogenetische Effekte diskutiert [Friedli et al. 2009]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit L1CAM Antikörpern zu einer erhöhten Infiltration von F4/P80 positiven Makrophagen führt, die möglicherweise über eine Freisetzung von NO zytotoxisch auf Tumorzellen wirken [Schäfer et al. 2012]. Ähnliche Effekte wurden in Tieren mit Ovarialkarzinomen verzeichnet, die einer Kombinationstherapie aus Paclitaxel und L1CAM-Antikörper unterzogen worden waren. Auch in diesen Experimenten führte die zusätzliche Behandlung mit L1-14.10 und L1-9.3 zu einer signifikant stärkeren Tumorreduktion als die

Behandlung mit Paclitaxel allein bzw. zusammen mit dem Kontrollantikörper [Schäfer et al. 2012].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Adhäsionsmolekül L1CAM eine geeignete Zielstruktur in PDAC- und Ovarialkarzinomzellen darstellt, um das Ansprechen auf Zytostatika und darüber die Therapierbarkeit dieser Tumore zu verbessern. Die beiden in dieser Arbeit getesteten L1CAM-Antikörper L1-14.10 und L1-9.3 wiesen dabei ein vergleichbares chemosensitivierendes Potential auf, so dass die therapeutische Wirksamkeit beider Antikörper, basierend auf diesen Ergebnissen, bereits in präklinischen Experimenten validiert wurde. Die Ergebnisse weisen auch daraufhin, dass optimale Effekte hinsichtlich der Chemosensitivierung nicht mit jedem Zytostatikum (hier 5-Fluorouracil und Cisplatin) erzielt und erwartet werden können. Aufgrund dieser Daten ist daher die Kombination mit Gemcitabin (oder auch Etoposid) beim PDAC und die Kombination mit Paclitaxel beim Ovarialkarzinom zu preferieren. Da sich die Wirksamkeit dieser Therapiestrategie in den präklinischen Versuchen bestätigen ließ, ist nun der Transfer in eine klinische Studie geplant.

## 6. Zusammenfassung

Sowohl das Pankreasadenokarzinom (PDAC) als auch das Ovarialkarzinom sind bedingt durch ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium bei Diagnosestellung sowie eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika immer noch schlecht therapierbare Tumorerkrankungen. Das Versagen von Chemotherapien kann in den Tumorzellen durch verschiedene Resistenzmechanismen verursacht werden, wobei ein erhöhter Schutz vor Apoptoseinduktion einen wesentlichen Mechanismus darstellt. Das Adhäsionsmolekül L1CAM ist in PDAC- sowie in Ovarialkarzinomzellen maßgeblich an der Apoptoseresistenz und damit an der Ausbildung eines chemoresistenten Phänotyps dieser Tumorzellen beteiligt. Eine Strategie, um das Ansprechen von Tumorzellen auf Zytostatika zu verbessern, stellt daher die Antikörper-vermittelte Blockade von L1CAM dar.

Ziel dieser Arbeit war es, vier verschiedene L1CAM-spezifische Antikörper auf ihre chemosensitivierende Wirkung an Zelllinien von zwei Tumorentitäten *in vitro* zu überprüfen. Als Modellzelllinien für das PDAC wurden die L1CAM-exprimierenden Zelllinien PT45-P1res und Colo357 und für das Ovarialkarzinom die Zelllinien Skov3ip und OV-MZ-6 verwendet. Die vier L1CAM-spezifischen Antikörper L1-9.3, L1-38.12, L1-35.9 und L1-14.10 wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml) in Kombination mit einem Zytostatikum im Vergleich zu einer Zytostatikatherapie allein bzw. in Kombination mit einem Kontrollantikörper auf ihr chemosensitivierendes Potential evaluiert. Zur chemotherapeutischen Behandlung der PDAC-Zelllinien wurden Etoposid und die Standardzytostatika Gemcitabin und 5-Fluorouracil eingesetzt. Die Ovarialkazinomzellen wurden mit den in der Klinik standardmäßig verwendeten Zytostatika Paclitaxel und Cisplatin behandelt.

Wie mittels durchflusszytometrischer Färbung gezeigt werden konnte, wiesen nur die Antikörper L1-14.10 und L1-9.3 eine hohe Bindungsaffinität gegenüber membranständigem L1CAM auf allen vier Tumorzelllinien auf, so dass nur diese beiden Antikörper auf ihre therapeutische Nutzung weiter evaluiert wurden. Im Caspase-3/-7-Assay sowie mit der TUNEL-Färbung zeigte sich, dass beide Antikörper in den höheren Konzentrationen das apoptotische Ansprechen der PDAC-Zelllinien nicht gegenüber 5-Fluorouracil, wohl aber gegenüber Etoposid und Gemcitabin deutlich zu erhöhen vermochten. Auch in den Ovarialkarzinomzelllinien führte die Kombination aus Paclitaxel und 5 bzw. 10 µg/ml von einem der beiden L1CAM-Antikörper zu einer verbesserten Apoptoseantwort im Vergleich zur Zytostatikabehandlung allein, wie mittels Caspase-3/-7-Assay und Annexin-V-/PI-

Färbung gezeigt werden konnte. Weniger ausgeprägt waren die Effekte in Kombination mit Cisplatin. Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist daher eine Kombinationstherapie aus L1CAM-Antikörpern mit Gemcitabin bzw. Etoposid beim PDAC sowie mit Paclitaxel beim Ovarialkarzinom weiter zu validieren.

Die siRNA-vermittelte Unterdrückung und damit Inhibition von L1CAM war bei optimaler Transfektionseffizienz der Antikörper-vermittelten Blockade hinsichtlich des chemosensitivierenden Potentials überlegen. Vor dem Hintergrund, dass aufgrund der L1CAM-Expression in neuronalen Zellen ein Übertritt von L1CAM-Therapeutika über die Blut-Hirn-Schranke zu vermeiden ist und über eine Antikörper-basierte Therapie zusätzliche immunmodulatorische Effekte zu erwarten sind, ist der Einsatz von anti-L1CAM-Antikörpern einer Behandlung mit siRNA vorzuziehen. Da sich die Ergebnisse dieser Arbeit in präklinischen Versuchen mittlerweile bestätigen ließen, ist nun der Transfer in eine klinische Studie geplant.



## 7. Literaturverzeichnis

Aebi, S & Castiglione, M 2008, 'Epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up,' *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*, vol. 19 Suppl 2, S. ii14-16.

Allory, Y, Matsuoka, Y, Bazille, C, Christensen, EI, Ronco, P & Debiec, H 2005, 'The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas,' *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 11, no. 3, S. 1190-1197.

Arlt, A, Vorndamm, J, Breitenbroich, M, Fölsch, UR, Kalthoff, H, Schmidt, WE & Schäfer, H 2001, 'Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin,' *Oncogene*, vol. 20, no. 7, S. 859-868.

Arlt, A, Vorndamm, J, Muerköster, S, Yu, H, Schmidt, WE, Fölsch, UR & Schäfer, H 2002, 'Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines,' *Cancer Research*, vol. 62, no. 3, S. 910-916.

Arlt, A, Gehrz, A, Muerköster, S, Vorndamm, J, Kruse, M, Fölsch, UR & Schäfer, H 2003, 'Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death,' *Oncogene*, vol. 22, no. 21, S. 3243-3251.

Arlt, MJE, Novak-Hofer, I, Gast, D, Gschwend, V, Moldenhauer, G, Grünberg, J, Honer, M, Schubiger, PA, Altevogt, P & Krüger, A 2006, 'Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment,' *Cancer Research*, vol. 66, no. 2, S. 936-943.

Bao, S, Wu, Q, Zhizhong, L, Sathornsumetee, S, Wang, H, McLendon, RE, Hjelmeland, AB & Rich, JN 2008, 'Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth,' *Cancer Research*, vol. 68, no. 15, S.6043-6048.

Barberis, L, Wary, KK, Fiucci, G, Liu, F, Hirsch, E, Brancaccio, M, Altruda, F, Tarone, G & Giancotti, FG 2000, 'Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in

integrin signaling to ERK,' *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 47, S. 36532-36540.

Beer, S, Oleszewski, M, Gutwein, P, Geiger, C & Altevogt, P 1999, 'Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule,' *Journal of Cell Science*, vol. 112 ( Pt 16), S. 2667-2675.

Ben, Q-W, Wang, J-C, Liu, J, Zhu, Y, Yuan, F, Yao, W-Y & Yuan, Y-Z 2010, 'Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma,' *Annals of Surgical Oncology*, vol. 17, no. 8, S. 2213-2221.

Bergmann, F, Wandschneider, F, Sipos, B, Moldenhauer, G, Schniewind, B, Welsch, T, Schirmacher, P, Klöppel, G, Altevogt, P, Schäfer, H & Sebens Mürköster, S 2010, 'Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma,' *Oncology Reports*, vol. 24, no. 4, S. 909-915.

Boo, Y, Park, J, Kim, J, Chae, Y, Min, B, Um, J & Moon, H 2007, 'L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer,' *Annals of Surgical Oncology*, vol. 14, no. 5, S. 1703-1711.

Boucher, MJ, Morisset, J, Vachon, PH, Reed, JC, Lainé, J & Rivard, N 2000, 'MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells,' *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 79, no. 3, S. 355-369.

Bowman, A, Gabra, H, Langdon, SP, Lessells, A, Stewart, M, Young, A & Smyth, JF 2002, 'CA125 response is associated with estrogen receptor expression in a phase II trial of letrozole in ovarian cancer: identification of an endocrine-sensitive subgroup,' *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 8, no. 7, S. 2233-2239.

Brekke, OH & Sandlie, I 2003, 'Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century,' *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 2, no. 1, S. 52-62.

Bristow, RE, Tomacruz, RS, Armstrong, DK, Trimble, EL & Montz, FJ 2002, 'Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a

meta-analysis,' *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 5, S. 1248-1259.

Brugge, WR, Lauwers, GY, Sahani, D, Fernandez-del Castillo, C & Warshaw, AL 2004, 'Cystic neoplasms of the pancreas,' *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 12, S. 1218-1226.

Cannistra, SA 2004, 'Cancer of the ovary,' *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 24, S. 2519-2529.

Chen, MM, Lee, C-Y, Leland, HA, Lin, GY, Montgomery, AM & Silletti, S 2010, 'Inside-out regulation of L1 conformation, integrin binding, proteolysis, and concomitant cell migration,' *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21, no. 10, S. 1671-1685.

Cho, KR & Shih, I 2009, 'Ovarian cancer,' *Annual Review of Pathology*, vol. 4, S. 287-313.

Chung, DC & Rustgi, AK 2003, 'The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications,' *Annals of Internal Medicine*, vol. 138, no. 7, S. 560-570.

Dijt, FJ, Fichtinger-Schepman, AM, Berends, F & Reedijk, J 1988, 'Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts,' *Cancer Research*, vol. 48, no. 21, S. 6058-6062.

Eckel, F, Schmid, RM 2006, 'Firstline- und Secondline-Therapie des Pankreaskarzinoms,' *Journal Onkologie*, 6. Jg., Ausgabe 4/06, S. 12-17.

Fogel, M, Gutwein, P, Mechtersheimer, S, Riedle, S, Stoeck, A, Smirnov, A, Edler, L, Ben-Arie, A, Huszar, M & Altevogt, P 2003a, 'L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas,' *Lancet*, vol. 362, no. 9387, S. 869-875.

Fogel, M, Mechtersheimer, S, Huszar, M, Smirnov, A, Abu-Dahi, A, Tilgen, W, Reichrath, J, Georg, T, Altevogt, P & Gutwein, P 2003b, 'L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma,' *Cancer Letters*, vol. 189, no. 2, S. 237-247.

Friedli, A, Fischer, E, Novak-Hofer, I, Cohrs, S, Ballmer-Hofer, K, Schubiger, PA, Schibli, R, Grünberg, J 2009, 'The soluble form of the cancer-associated L1 cell adhesion

molecule is a pro-angiogenic factor,' *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*, vol 41, S. 1572-1580.

Fulda, S & Debatin, K 2006, 'Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy,' *Oncogene*, vol. 25, no. 34, S. 4798-4811.

Gast, D, Riedle, S, Issa, Y, Pfeifer, M, Beckhove, P, Sanderson, MP, Arlt, M, Moldenhauer, G, Fogel, M, Krüger, A & Altevogt, P 2008, 'The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies,' *Oncogene*, vol. 27, no. 9, S. 1281-1289.

Gavert, N, Conacci-Sorrell, M, Gast, D, Schneider, A, Altevogt, P, Brabletz, T & Ben-Ze'ev, A 2005, 'L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers,' *The Journal of Cell Biology*, vol. 168, no. 4, S. 633-642.

Gavert, N, Sheffer, M, Raveh, S, Spaderna, S, Shtutman, M, Brabletz, T, Barany, F, Paty, P, Notterman, D, Domany, E & Ben-Ze'ev, A 2007, 'Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis,' *Cancer Research*, vol. 67, no. 16, S. 7703-7712.

Geismann, C, Morscheck, M, Koch, D, Bergmann, F, Ungefroren, H, Arlt, A, Tsao, M, Bachem, MG, Altevogt, P, Sipos, B, Fölsch, UR, Schäfer, H & Mürköster, SS 2009, 'Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer,' *Cancer Research*, vol. 69, no. 10, S. 4517-4526.

Gilks, CB & Prat, J 2009, 'Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances,' *Human Pathology*, vol. 40, no. 9, S. 1213-1223.

Glennie, MJ & van de Winkel, JGJ 2003, 'Renaissance of cancer therapeutic antibodies,' *Drug Discovery Today*, vol. 8, no. 11, S. 503-510.

Gnad-Vogt, U, Falk, M, Kallen, KJ 2006, 'Pankreaskarzinom: EGFR- und Immuntherapie,' *Journal Onkologie*, 6. Jg., Ausgabe 4/06, S. 18-25.

Gutwein, P, Oleszewski, M, Mechtersheimer, S, Agmon-Levin, N, Krauss, K & Altevogt, P 2000, 'Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells,' *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 20, S. 15490-15497.

Gutwein, P, Stoeck, A, Riedle, S, Gast, D, Runz, S, Condon, TP, Marmé, A, Phong, M, Linderkamp, O, Skorokhod, A & Altevogt, P 2005, 'Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells,' *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 11, no. 7, S. 2492-2501.

Hagmann, W, Jesnowski, R, Faissner, R, Guo, C & Löhr, JM 2009, 'ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells,' *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* vol. 9, no. 1-2, S. 136-144.

Harter, P, du Bois, A, Hahmann, M, Hasenburg, A, Burges, A, Loibl, S, Gropp, M, Huober, J, Fink, D, Schröder, W, Muenstedt, K, Schmalfeldt, B, Emons, G, Pfisterer, J, Wollschlaeger, K, Meerpohl, HG, Breitbach, GP, Tanner, B & Schouli, J 2006, 'Surgery in Recurrent Ovarian Cancer: The Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR Trial,' *Annals of Surgical Oncology*, vol. 13, no. 12, S. 1702-1710.

Hengartner, MO 2000, 'The biochemistry of apoptosis,' *Nature*, vol. 407, no. 6805, S. 770-776.

Herold, G und Mitarbeiter, *Innere Medizin 2010*, Auflage 2010, Gerd Herold, Köln.

Hezel, AF, Kimmelman, AC, Stanger, BZ, Bardeesy, N & Depinho, RA 2006, 'Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma,' *Genes & Development*, vol. 20, no. 10, S. 1218-1249.

Husmann, G., P. Kaatsch, A. Katalinic, J. Bertz, J. Haberland, K. Kraywinkel und U. Wolf 2010. 'Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends 7. Ausgabe.' Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin.

Kaifi, JT, Strelow, A, Schurr, PG, Reichelt, U, Yekebas, EF, Wachowiak, R, Quaas, A, Strate, T, Schaefer, H, Sauter, G, Schachner, M & Izbicki, JR 2006, 'L1 (CD171) is highly expressed

in gastrointestinal stromal tumors,' *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 19, no. 3, S. 399-406.

Kaifi, JT, Reichelt, U, Quaas, A, Schurr, PG, Wachowiak, R, Yekebas, EF, Strate, T, Schneider, C, Pantel, K, Schachner, M, Sauter, G & Izbicki, JR 2007, 'L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer,' *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 20, no. 11, S. 1183-1190.

King, M, Marks, JH & Mandell, JB 2003, 'Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2,' *Science (New York, N.Y.)*, vol. 302, no. 5645, S. 643-646.

Kiefel, H, Bondong, S, Erbe-Hoffmann, N, Hazin, J, Riedle, S, Wolf, J, Pfeifer, M, Arlt, A, Schäfer, H, Muerköster, SS & Altevogt, P 2010, 'L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression,' *Oncogene*, vol. 29, no. 34, S. 4766-4778.

Kroemer, G & Martin, SJ 2005, 'Caspase-independent cell death,' *Nature Medicine*, vol. 11, no. 7, S. 725-730.

Kurman, RJ & Shih, I 2010, 'The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory,' *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 34, no. 3, S. 433-443.

Lage, H & Dietel, M 1999, 'Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance,' *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 125, no. 3-4, S. 156-165.

Lage, H & Denkert, C 2007, 'Resistance to chemotherapy in ovarian carcinoma,' *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, vol. 176, S. 51-60.

Li, D, Xie, K, Wolff, R & Abbruzzese, JL 2004a, 'Pancreatic cancer,' *Lancet*, vol. 363, no. 9414, S. 1049-1057.

Lillemoe, KD, Yeo, CJ & Cameron, JL 2000, 'Pancreatic cancer: state-of-the-art care,' *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 50, no. 4, S. 241-268.

Liu, L, Xing, D & Chen, WR 2009, 'Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis,' *International Journal of Cancer*, vol. 125, no. 12, S. 2757-2766.

Lüttges, J & Klöppel, G 2005, 'Pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursors,' *Der Pathologe*, vol. 26, no. 1, S. 12-17.

Maitra, A, Fukushima, N, Takaori, K & Hruban, RH 2005, 'Precursors to invasive pancreatic cancer,' *Advances in Anatomic Pathology*, vol. 12, no. 2, S. 81-91. Manning, BD & Cantley, LC 2007, 'AKT/PKB signaling: navigating downstream,' *Cell*, vol. 129, no. 7, S. 1261-1274.

Maretzky, T, Schulte, M, Ludwig, A, Rose-John, S, Blobel, C, Hartmann, D, Altevogt, P, Saftig, P & Reiss, K 2005, 'L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth,' *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, no. 20, S. 9040-9053.

Markman, M, Iseminger, KA, Hatch, KD, Creasman, WT, Barnes, W & Dubeshter, B 1996, 'Tamoxifen in Platinum-Refractory Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Ancillary Report,' *Gynecologic Oncology*, vol. 62, S. 4-6.

Materna, V, Pleger, J, Hoffmann, U & Lage, H 2004, 'RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response,' *Gynecologic Oncology*, vol. 94, no. 1, S. 152-160.

Materna, V, Liedert, B, Thomale, J & Lage, H 2005, 'Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells,' *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 115, no. 3, S. 393-402.

McGuire, WP, Hoskins, WJ, Brady, MF, Kucera, PR, Partridge, EE, Look, KY, Clarke-Pearson, DL & Davidson, M 1996, 'Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer,' *The New England Journal of Medicine*, vol. 334, no. 1, S. 1-6.

Mechtersheimer, S, Gutwein, P, Agmon-Levin, N, Stoeck, A, Oleszewski, M, Riedle, S, Postina, R, Fahrenholz, F, Fogel, M, Lemmon, V & Altevogt, P 2001, 'Ectodomain shedding

of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins,' *The Journal of Cell Biology*, vol. 155, no. 4, S. 661-673.

Möbus, V, Gerharz, CD, Press, U, Moll, R, Beck, T, Mellin, W, Pollow, K, Knapstein, PG & Kreienberg, R 1992, 'Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines,' *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 52, no. 1, S. 76-84.

Montgomery, AM, Becker, JC, Siu, CH, Lemmon, VP, Cheresch, DA, Pancook, JD, Zhao, X & Reisfeld, RA 1996, 'Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3,' *The Journal of Cell Biology*, vol. 132, no. 3, S. 475-485.

Müerköster, S, Arlt, A, Witt, M, Gehr, A, Haye, S, March, C, Grohmann, F, Wegehenkel, K, Kalthoff, H, Fölsch, UR & Schäfer, H 2003, 'Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer,' *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 104, no. 4, S. 469-476.

Müerköster, S, Arlt, A, Sipos, B, Witt, M, Grossmann, M, Klöppel, G, Kalthoff, H, Fölsch, UR & Schäfer, H 2005, 'Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit betaTRCP1 relates to constitutive nuclear factor-kappaB activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells,' *Cancer Research*, vol. 65, no. 4, S. 1316-1324.

Müerköster, SS, Lust, J, Arlt, A, Häsler, R, Witt, M, Sebens, T, Schreiber, S, Fölsch, UR & Schäfer, H 2006, 'Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases,' *Oncogene*, vol. 25, no. 28, S. 3973-3981.

Nayeem, N, Silletti, S, Yang, X, Lemmon, VP, Reisfeld, RA, Stallcup, WB & Montgomery, AM 1999, 'A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1,' *Journal of Cell Science*, vol. 112 ( Pt 24), S. 4739-4749.

Novak-Hofer, I, Cohrs, S, Grünberg, J, Friedli, A, Schlatter, MC, Pfeifer, M, Altevogt, P & Schubiger, PA 2008, 'Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells,' *Cancer Letters*, vol. 261, no. 2, S. 193-204.



Oldham, RK & Dillman, RO 2008, 'Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress,' *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 11, S. 1774-1777.

Pomel, C, Jeyarajah, A, Oram, D, Shepherd, J, Milliken, D, Dauplat, J & Reynolds, K 2007, 'Cyto-reductive surgery in ovarian cancer,' *Cancer Imaging: The Official Publication of the International Cancer Imaging Society*, vol. 7, S. 210-215.

Raff, M 1998, 'Cell suicide for beginners,' *Nature*, vol. 396, no. 6707, S. 119-122.

Raveh, S, Gavert, N & Ben-Ze'ev, A 2009, 'L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors,' *Cancer Letters*, vol. 282, no. 2, S. 137-145.

Reid, RA & Hemperly, JJ 1992, 'Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA,' *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 3, S. 127-135.

Saur, D, Schneider, G, Schmid, RM 2006, 'Pankreaskarzinom- State of the Art.' *Kompandium Gastroenterologie*, 2. Jahrg. 2006, Nr. 1.

Schäfer, H, Dieckmann, C, Kornienko, O, Moldenhauer, G, Kiefel, H, Salnikov, A, Krüger, A & Sebens, S 2012, 'Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma,' *Cancer Letters*, vol. 319, S. 66-82.

Schneider, G, Siveke, JT, Eckel, F & Schmid, RM 2005, 'Pancreatic cancer: basic and clinical aspects,' *Gastroenterology*, vol. 128, no. 6, S. 1606-1625.

Sebens Mürköster, S, Lust, J, Arlt, A, Häsel, R, Witt, M, Sebens, T, Schreiber, S & Fölsch, UR 2006, 'Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1 $\beta$  and NO lead to inactivation of caspases,' *Oncogene*, vol. 25, no. 28, S. 3973-3981.

Sebens Mürköster, S, Werbing, V, Sipos, B, Debus, MA, Witt, M, Grossmann, M, Leisner, D, Kötteritzsch, J, Kappes, H, Klöppel, G, Altevogt, P, Fölsch, UR & Schäfer, H 2007, 'Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells,' *Oncogene*, vol. 26, no. 19, S. 2759-2768.

Sebens Mürköster, S, Kötteritzsch, J, Geismann, C, Gast, D, Kruse, M, Altevogt, P, Fölsch, UR & Schäfer, H 2009, 'alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma,' *International Journal of Oncology*, vol. 34, no. 1, S. 243-253.

Seidman, JD, Horkayne-Szakaly, I, Haiba, M, Boice, CR, Kurman, RJ & Ronnett, BM 2004, 'The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin,' *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, vol. 23, no. 1, S. 41-44.

Shih, I & Kurman, RJ 2004, 'Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis,' *The American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 5, S. 1511-1518.

Staebler, A & Diebold, J 2007, '[Molecular pathology of epithelial ovarian neoplasias: from the phenotype-genotype correlation to new targets in diagnostics and therapy.],' *Der Pathologe*, vol. 28, no. 3, S. 180-186.

Stauber, M, Weyerstahl, T & Hormann, J 2005, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2. Aufl, Thieme, Stuttgart.

Stoeck, A, Gast, D, Sanderson, MP, Issa, Y, Gutwein, P & Altevogt, P 2007, 'L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells,' *Gynecologic Oncology*, vol. 104, no. 2, S. 461-469.

Stordal, B, Pavlakakis, N & Davey, R 2007, 'A systematic review of platinum and taxane resistance from bench to clinic: an inverse relationship,' *Cancer Treatment Reviews*, vol. 33, no. 8, S. 688-703.

Struewing, JP, Hartge, P, Wacholder, S, Baker, SM, Berlin, M, McAdams, M, Timmerman, MM, Brody, LC & Tucker, MA 1997, 'The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews,' *The New England Journal of Medicine*, vol. 336, no. 20, S. 1401-1408.

Surowiak, P, Materna, V, Kaplenko, I, Spaczynski, M, Dolinska-Krajewska, B, Gebarowska, E, Dietel, M, Zabel, M & Lage, H 2006, 'ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and

clinical outcome,' *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 12, no. 23, S. 7149-7158.

Takeda, Y, Asou, H, Murakami, Y, Miura, M, Kobayashi M & Uyemura K 1996, 'A non-neuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis,' *Journal of Neurochemistry*, vol. 66, S. 2338-2349.

Tsutsumi, S, Morohashi, S, Kudo, Y, Akasaka, H, Ogasawara, H, Ono, M, Takasugi, K, Ishido, K, Hakamada, K & Kijima, H 2011, 'L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma,' *Journal of Surgical Oncology*, vol. 103, no. 7, S. 669-673.

Vermeulen, K, Van Bockstaele, DR & Berneman, ZN 2005, 'Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer,' *Annals of Hematology*, vol. 84, no. 10, S. 627-639.

Von Mensdrff-Pouilly, S 2010, 'Vaccine-induced antibody responses in patients with carcinoma,' *Expert Review of Vaccines*, vol. 9, no. 6, S. 579-594.

Westhoff, M & Fulda, S 2009, 'Adhesion-mediated apoptosis resistance in cancer,' *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, vol. 12, no. 4-5, S. 127-136.

Weston, CR, Balmano, K, Chalmers, C, Hadfield, K, Molton, SA, Ley, R, Wagner, EF & Cook, SJ 2003, 'Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER\* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways,' *Oncogene*, vol. 22, no. 9, S. 1281-1293.

Westphal, S & Kalthoff, H 2003, 'Apoptosis: targets in pancreatic cancer,' *Molecular Cancer*, vol. 2, S. 6.

Winter-Roach, B, Hooper, L & Kitchener, H 2003, 'Systematic review of adjuvant therapy for early stage (epithelial) ovarian cancer,' *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, vol. 13, no. 4, S. 395-404.

Wolterink, S, Moldenhauer, G, Fogel, M, Kiefel, H, Pfeifer, M, Lüttgau, S, Gouveia, R, Costa, J, Endell, J, Moebius, U & Altevogt, P 2010, 'Therapeutic antibodies to human L1CAM: functional characterization and application in a mouse model for ovarian carcinoma,' *Cancer Research*, vol. 70, no. 6, S. 2504-2515.

Yan, L, Lavin, VA, Moser, LR, Cui, Q, Kanies, C & Yang, E 2008, 'PP2A regulates the pro-apoptotic activity of FOXO1,' *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 12, S. 7411-7420.

Young, RC, Walton, LA, Ellenberg, SS, Homesley, HD, Wilbanks, GD, Decker, DG, Miller, A, Park, R & Major, F 1990, 'Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials,' *The New England Journal of Medicine*, vol. 322, no. 15, S. 1021-1027.

Zhang W, Zhang C, Narayani N, Du C & Balaji KC 2007, 'Nuclear translocation of apoptosis inducing factor is associated with cisplatin induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells,' *Cancer Letters*, vol. 255, no. 1, S. 127-134.

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Struktur des L1CAM-Moleküls.	30
Abb. 2: L1CAM-Färbung von PT45-P1res Zellen mittels Durchflusszytometrie.	31
Abb. 3: L1CAM-Färbung von Colo357 Zellen mittels Durchflusszytometrie.	33
Abb. 4: L1CAM-Färbung von OV-MZ-6 Zellen mittels Durchflusszytometrie.	34
Abb. 5: L1CAM-Färbung von Skov3ip Zellen mittels Durchflusszytometrie.	34
Abb. 6: Caspase-3/-7-Aktivität in PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin.	36
Abb. 7: Caspase-3/-7-Aktivität in PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit Etoposid.	37
Abb. 8: Caspase-3/-7-Aktivität in PT45-P1res Zellen nach Behandlung mit 5-Fluorouracil.	38
Abb. 9: Caspase-3/-7-Aktivität in Colo357 Zellen nach Behandlung mit Gemcitabin.	39
Abb. 10: Caspase-3/-7-Aktivität in Colo357 Zellen nach Behandlung mit Etoposid.	40
Abb. 11: Caspase-3/-7-Aktivität in Colo357 Zellen nach Behandlung mit 5-Fluorouracil.	41
Abb. 12: Caspase-3/-7-Aktivität in OV-MZ-6 Zellen nach Behandlung mit Cisplatin.	42
Abb. 13: Caspase-3/-7-Aktivität in OV-MZ-6 Zellen nach Behandlung mit Paclitaxel.	43
Abb. 14: Caspase-3/-7-Aktivität in Skov3ip Zellen nach Behandlung mit Cisplatin.	44
Abb. 15: Caspase-3/-7-Aktivität in Skov3ip Zellen nach Behandlung mit Paclitaxel.	44
Abb. 16: TUNEL-Assay mit PT45-P1res Zellen.	47
Abb. 17: TUNEL-Assay mit Colo357 Zellen.	49
Abb. 18: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> der L1CAM-Expression in PT45-P1res Zellen.	53
Abb. 19: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> der L1CAM-Expression in Colo357 Zellen.	54
Abb. 20: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> der L1CAM-Expression in OV-MZ-6 Zellen.	56
Abb. 21: siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> der L1CAM-Expression in Skov3ip Zellen.	57

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette-Transporter</i>
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
ADAM	<i>A disintegrin and Metalloproteinase</i>
Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosin-Triphosphat
BRCA1, BRCA2	Brustkrebsgen 1, 2 ( <i>breast cancer 1, 2</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
ca.	Circa
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DISC	Todessignal induzierender Komplex ( <i>death-inducing signal complex</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ERK	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d' Obstétrique</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP	<i>FADD-like ICE inhibitory protein</i>
FN	Fibronectin
HER- 2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom ( <i>hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome</i> )
IAP	Apoptoseinhibitoren ( <i>inhibitors of apoptosis protein</i> )
Ig-Domäne	Immunglobulin-ähnliche Domäne
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IPMN	Intraduktale Papillär Muzinöse Neoplasie
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCN	Muzinös Zystische Neoplasie
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
mIgG1	Maus-Immunglobulin G1
min.	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MRP2/5	<i>Multidrug resistance protein 2/5</i>
mRNA	Botenribonukleinsäure ( <i>messenger RNA</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur ( <i>nucleotide excision repair</i> )
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom ( <i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i> )
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PRSS1	Kationisches Trypsinogen, Serin-Protease-1
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Medium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institut
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
s.o.	Siehe oben
sog.	Sogenannte
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labelling</i>

u.a.

Unter anderem

VEGF

*Vascular Endothelial Growth Factor*



## **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Susanne Sebens. Sie stand mir stets mit Geduld, Rat und Tat, konstruktiver Kritik sowie einer großen Portion Motivation zur Seite. Ohne ihre hervorragende und engagierte Betreuung sowohl während der Zeit im Labor als auch anschließend während der Phase des Schreibens wäre diese Arbeit nicht fertig geworden.

Herrn Prof. Dr. Heiner Schäfer danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die entspannte Arbeitsatmosphäre sowie für sein Engagement und seine Hilfestellungen insbesondere während der praktischen Phase dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für ihre geduldige Einarbeitung und ständige Hilfsbereitschaft in allen praktisch-technischen Belangen sowie für die kollegiale Arbeitsatmosphäre danke ich Iris Bauer, Maike Großmann, Eike Jürgens, Dagmar Leisner und Maike Witt-Ramdohr.

Großen Dank gilt meinen Mitdotorandinnen Claudia Geismann für viele Tipps, Tricks und dem Spaß an der Arbeit sowie Mascha Morscheck und Frauke Wandschneider für einige vernünftige Laborstunden am Wochenende oder abends.

Meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und Zeit während jeder Phase dieser Arbeit in der ich ihnen mein „Leid“ geklagt habe sowie für die vielen Tipps und Tricks beim Überleben mit Windows.

Zuletzt und zuerst danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre unendliche und bedingungslose Motivation und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne euch wäre ich nie soweit gekommen! Danke!

## 10. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Chantal Dieckmann  
 Geburtsdatum: 02.06.1985  
 Geburtsort: Recklinghausen  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulausbildung

1991 - 2004 Nicolaischule und Ernst-Barlach-Gymnasium Unna,  
 Allgemeine Hochschulreife  
 2000 -2001 MacDuffie School, Springfiel (Massachusetts, USA)

### Studium

2004 – 2006 Vorklinisches Medizinstudium an der Chrsitian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 08 / 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 2006 – 2009 Klinisches Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 2009 – 2010 Auslandssemester an der Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares (Spanien)  
 2010 – 2011 Praktisches Jahr an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Innere Medizin: Regionalspital Rheinfelden, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Basel, Schweiz; Chirurgie: Städtisches Krankenhaus Kiel; Radiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin: UKSH Campus Kiel)  
 06 / 2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 06 / 2011 Approbation als Ärztin

### Berufliche Tätigkeit

Seit 10 / 2011 Assistenzärztin am Institut für Radiologie, Herz-Jesu-Krankenhaus Münster-Hiltrup

**Dissertation**

10 / 2007 – 02 / 2009

Wissenschaftliche Arbeiten zu dem Thema „Evaluierung L1CAM blockierender Antikörper zur Chemosensitivierung hochmaligner und chemoresistenter Tumore.“ im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, Klinik für Innere Medizin I am UKSH Campus Kiel.